



Caracterització fenotípica i funcional de membres solubles de la superfamília de receptors scavenger rics en cisteïna (SF-SRCR)

Cristina Miró Julià

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



Unitat d'Immunologia
Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències
Facultat de Medicina

**Caracterització fenotípica i funcional de membres
solubles de la superfamília de receptors *scavenger*
rics en cisteïna (SF-SRCR)**

Memòria de tesi presentada per:

Cristina Miró Julià

per optar al Grau de:

Doctora per la Universitat de Barcelona
Programa de Doctorat de Biomedicina

Director de tesi:

Dr. Francisco Lozano Soto

Barcelona, Gener 2013

Als meus avis, per poder parlar de tot i donar-me perspectiva.

Als meus pares, el meu referent, per ensenyar-me sempre i
recolzar-me a cada pas.

A la meva germana, la perfecta companya de viatge,
sigui quina sigui l'aventura.

A en Dani, per mirar-me sempre amb aquests ulls
i estimular-me a ser la persona que ells veuen.

Agraiments

Voldria donar les gràcies a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han intervingut en la realització d'aquesta tesi: sense elles aquest treball no hagués estat possible.

En primer lloc agrair al Dr. Lozano, director d'aquesta tesi, haver-me acceptat al seu grup, obrint-me així la porta a la immunologia i "al món dels *scavengers*". Gràcies per la llibertat oferta per explorar les pròpies idees, així com el suport perquè pogués marxar fora durant la meva tesi. També vull agrair-li la seva enorme capacitat de treball, perseverança i minucioses correccions al llarg d'aquest treball.

A tots els components del grup, "els Pacos", tant els que han marxat com les noves incorporacions, l'Esther Carreras, la Marta, la Inês, en Marc i la Noe, pels bons i no tan bons moments compartits, a més de poidates, aparells, (poc) espai, idees i bromes ;). Gràcies a la Cristina Astasio, Lucía i Maite per ajudar-me tant a l'inici d'aquesta tesi quan anava ben perduda;) Al Rafa per ensenyar-me a no ser tan cap quadrada i a cuidar més els contactes. Gràcies al Mario per voler donar sempre un cop de mà i algun ratolí de tant en tant. A la Vanesa per totes les gestions, l'anglès après i els reactius enviats. A la Lisy per mantenir sempre la calma i regalar un somriure quan les coses es compliquen. A la Mireia Antón per estar sempre disposada a ajudar en qualsevol moment i des de qualsevol lab/servei. Agrair especialment a la meva "PASDAC" de capçalera i a la meva galectina preferida, moltíssimes gràcies per tot, dins i fora del lab, des de Barcelona o des de NYC. Gràcies Esther Carrasco i Cristina Escoda per, en un món de ratolins CD6 i CD5, ajudar-me a tirar endavant un projecte alternatiu. Gràcies per les idees, l'ajuda, pels cafès, les birres, els *WhatsApps* i per la paciència quan estic de mal humor (ja ho sabeu, jo no em "disgusto");). Sense vosaltres el valor d'aquesta tesi, l'experimental i el personal seria un altre.

Gràcies al servei d'Immunologia del Clínic, abans d'"immuno" de la 5-5, per tota l'ajuda, reactius i aparells prestats. Agrair especialment la col·laboració i l'alegria dels cracks del "CAMAROTE": Núria, Cristina, Laia, Víctor i Isaac. No es pot fer més amb menys: generar tant bon rotllo per metre quadrat. Agrair també tota l'ajuda i les idees del Dr. Serra-Pagès al llarg d'aquesta tesi. Gràcies especials també al "PROFESSOR" Caballero, per ser tan autèntic. Gràcies per ensenyar-me que el millor professor/tutor és la determinació d'un mateix. I també a la Dra. Glòria Soldevilla per ajudar-me a no tenir por de provar coses diferents i per la seva passió contagiosa per la recerca.

A tota la gent de la planta 1 (al grup germà d'immunos i als de Micro) per les conyes compartides passadís amunt, passadís avall, i a la Lab Manager del CEK, Cristina Canaleta, per fer-ho tot fàcil, quan no ho és gens.

Gràcies a tot el personal administratiu de la Fundació Clínic, especialment a la Sandra Pérez per tota l'ajuda prestada per aconseguir les beques de l'esperpèntic Ministerio de Educación. També agrair la feina al programa de doctorat de Biomedicina de l'Anna Alsina, sense ella l'*sprint* burocràtic final de la tesi hagués estat impossible.

Many thanks to Professor Qais Al-awqati for many things: first, for answering the first e-mail@gmail.com from an unknow student. Thank you for opening me the doors of your lab and NYC, and for showing me the secrets of renal physiology, it's an amazing field. I'll be always gratefull for the chance of learning how to ask the important questions, and carry out the smartest scientific approach. Thanks also to Dr. Joan Oliver and Dra. Rosemary Samponga for their lessons and all help given, as well as Dr. Gao for all the samples and protocols shared. I would like to thank Shaun, Sumreen and Alexander for their friendship and companionship at Columbia University.

Gràcies també a en Dani per no dubtar ni un sol moment, en aquest 5 anys, que me'n sortiria. Gràcies per entendre que calia marxar i gràcies per la infinita

paciència i per encarregar-se de tot durant aquests mesos d'escriptura. Gràcies a la meva germana, la meva còmplice en tot. Per dir-me "Margulitza" i donar-me forces cada cop que ho necessito. Gràcies per corregir i re-correr la tesi, pàgines i pàgines de paraulotes. Gràcies als meus pares per tota la força, cultura de l'esforç i la felicitat regalades. Gràcies per no acceptar mai ni una excusa i predicar sempre amb l'exemple. Gràcies al meu pare per obrir-me tant el camp de visió i donar-me la mesura exacte de les coses. Gràcies per ensenyar-me que tot coneixement és valor i que la seva aplicació sempre ha de ser l'última pregunta. Gràcies per la seva sensibilitat i la seva manera d'entendre la vida. Gràcies a la meva mare, cirurgiana i investigadora –tot un orgull-, per educar-me en les seves infinites ganes de treballar amb coratge i alegria. Gràcies per ser tan sàvia i senzilla, per escoltar sempre i respondre amb un silenci, esperant que jo mateixa trobés la meva resposta.

A la meva família: avis/es, tiet/es, cosins/es; a la Glòria, en Joan Carles, en Josep Maria i la Fe per per tot el suport i preguntar-me: "Com va la tesi?", tot i que sovint no sàpiga explicar el que faig.

I citant les paraules d'un altre: Als meus amics/amigues, a qui darrerament no he cuidat gaire i, malgrat tot, no han fugit.

MOLTES GRÀCIES

Índex

JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL	5
ABREVIATURES	9
INTRODUCCIÓ	13
1. Homeostàsi general i el sistema immunitari	15
1.1. Immunitat Innata	16
1.1.1. Els epitelis: Barreres naturals contra les infeccions	18
1.1.1.1. Mucines	19
1.1.2. Reconeixement dels patògens: receptor reconeixedor de patògens i els seus lligands	21
1.2. El Sistema Immunitari i l'evolució	24
2. Els receptors TLR (<i>Toll-like</i> receptors)	25
3. Receptors reconeixedor de carbohidrats	29
3.1. RRC solubles	30
3.1.1. Colectines: MBL, SP-A i SP-D	30
3.1.2. Ficolines	32
3.1.2.1. Ficolines no humanes	34
3.1.3. Galectines	35
3.2. RRC de membrana	38
3.2.1. Receptor de manosa	38
3.2.2. Dectin-1	39
3.2.3. DC-SIGN	41
4. Receptors <i>Scavenger</i> (SR)	42
4.1. Classe A dels SR o Superfamília SRCR	43
4.1.1. El domini SRCR	44
4.2. Membres SRCR del grup A	47
4.2.1. SR-A	47
4.2.2. MARCO	49
4.2.3. SCARA5	50
4.2.4. Mac2 binding protein (M2BP)	51
4.3. Membres SRCR del grup B	51
4.3.1. Receptors únicament amb dominis SRCR	52
4.3.1.1. CD5 i CD6	52
4.3.1.2. CD163	57
4.3.1.3. Sp α /AIM	59

4.3.1.4. S4D-SRCRB	61
4.3.2. Receptors amb regions extracel·lulars mosaics	61
4.3.2.1 DMBT1/ Muclin	61
4.3.2.1.a Formes i expressió de DMBT1	61
4.3.2.1.b. Regulació i funció de DMBT1	64
4.3.2.1.c. El rol de DMBT1 en la diferenciació i regeneració d'epitelis	67
HIPÒTESI I OBJECTIUS	71
CAPÍTOL I	77
Molecular and functional characterization of mouse S5D-SRCRB: a new group B member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily.	
CAPÍTOL II	99
Expression S5D-SRCRB in the urogenital tract.	
CAPÍTOL III	127
Deletion of hensin/DMBT1 blocks conversion of beta- to alpha-intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis.	
CAPÍTOL IV	137
S4D-SRCRB, a soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich superfamily is a dual-specific pattern recognition receptor for self and non-self structures.	
DISCUSSIÓ	153
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAFIA	171
ANNEX	181

Justificació del treball

El treball de tesi que es presenta va ser realitzat amb la beca predoctoral AP2007-02223 "Formación de Profesorado Universitario" (FPU), al grup d'Immunoreceptors del Sistema Innat i Adaptatiu de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer de l'Hospital Clínic de Barcelona i l'Universitat de Barcelona dirigit pel Dr. Francisco Lozano. Part de la investigació es va desenvolupar a la Universitat de Columbia (Nova York) en dos períodes entre el 2010 i el 2012, gràcies a l'obtenció de dues "Estancias breves" pel Ministerio de Educación (MEC) (AP2007-02223-2009; AP2007-02223-2011).

Aquest treball aprofundeix en els estudis iniciats per integrants previs del grup (Sra. Sandra Roselló i Dra. Olga Padilla), on la finalitat dels quals era identificar nous gens no limfoides del grup B de la Superfamília de Receptors *Scavenger* Rics en Cisteïna (SRCR-SF). Amb aquest propòsit es va cercar el patró de cisteïnes consens del domini SRCR del grup B, mitjançant eines bioinformàtiques. L'estratègia seguida va permetre identificar dos possibles gens de la superfamília: S4D-SRCRB i S5D-SRCRB.

El motiu d'aquesta tesi ha estat caracteritzar molecularment i funcionalment els dos genes novells identificats pel nostre grup de recerca pertenyents al grup B de la súperfamília SRCR. Alhora que s'explorava el possible i emergent rol funcional, segons indicaven els resultats aleshores publicats, en la defensa innata i la diferenciació cel·lular, de DMBT1, un membre prototípic del grup.

Abreviatures

aa	aminoàcid
acLDL	LDL acetilats
AGS	línia cel·lular, adenocarcinoma d'estómac humà
ALCAM/CD166	l·ligand d'adhesió cel·lular de leucòcits activats
Breg	cèl·lules B reguladores
BCR	receptor de cèl·lules B
BTB/POZ	domini, <i>Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac / Poxvirus and Zinc-finger</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CUB	domini, C1r/C1s-Uegf-Bmp1
DAMPs	patrons moleculars associats a perill
DC	Cèl·lules dendrítiques
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DMBT1	<i>Deleted in Malignant Brain Tumor 1</i>
DNA	àcid desoxirribonuclèic
DRC	domini de reconeixement de carbohidrats
ER	reticle endoplasmàtic
Gal	galactosa
Gal-1	Galectina 1
Gal-3	Galectina 3
GalNAc/NacGal	N-acetilgalactosamina
GlcNAc/NAG/NacGal	N-acetil-D-glucosamina
gp	glicoproteïna
Hb-Hp	complex hemoglobina-haptoglobina
IAV	virus influenza tipus A
IC	cèl·lules intercalades
ICAM-3	<i>Intercellular adhesion molecule 3</i>
IFN	interferó
IgA	immunoglobulina, isotipus A
IgV_H	immunoglobulina, cadena pesada
IL	interleucina
IVR	domini, <i>intervening region</i>
kDa	kiloDalton
KO	<i>knockout</i>
LDL	lipoproteïnes de baix pes molecular
LPS	lipopolisacàrid
LTA	àcid lipoteicoic
M2BP	<i>Mac2 binding protein</i>
MAMPs	patrons moleculars associats a microbis
ManNAc	N-acetil-D-manosamina
MARCO	<i>Macrophage Receptor with Collagenous</i>
MASP	<i>mannose-binding protein-associated serine protease</i>
MBL	<i>mannose-binding lectin</i>
MHC-I	complex major d'histocompatibilitat de classe I
MR/ CD206	receptor de manosa
MUC	mucina
MW	<i>molecular weight</i>

NF-κB	factor nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killers</i>
NOD	domini, <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
oxLDL	LDL oxidats
PAMP	patrons moleculars associats a patògens
PBL	leucòcits de sang perifèrica
PGN	peptidogluca
PMA	<i>phorbol 12- myristate 13-acetate</i>
PST	prolina, serina i treonina
RLC	receptors de lectines de tipus C
RNA	àcid ribonuclèic
RRC	receptors reconeixadors de carbohidrats
RSV	virus sincitial respiratori
S4D-SRCRB	<i>soluble 4 domains-SRCR</i>
S5D-SRCRB	<i>soluble 5 domains-SRCR</i>
SAG	<i>salivary agglutinin</i>
SCARA5	<i>class A scavenger receptor member 5</i>
SF	superfamília
SID	<i>SRCR interspersed domain</i>
SP-A	proteïna surfactant A
SP-D	proteïna surfactant D
SR	receptor <i>scavenger</i>
SR-A	receptor <i>scavenger</i> de classe A
SRCR	domini, receptors <i>scavenger</i> rics en cisteïna
T reg	cèl·lules T reguladores
T verges	cèl·lules T verges
TCR	receptor de cèl·lules T
TFFs	<i>Trefoil factors</i>
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	citocina, <i>Tumor necrosis factor</i>
VAMP	patró molecular associat a la virulència
VIH-I	virus de la immunodeficiència humana tipus I
ZP	domini, <i>zona pellucida</i>

Introducció

1. Homeostàsi general i el sistema immunitari

El manteniment de l'homeòstasi general de l'organisme -en els animals superiors- és fruit de l'acció combinada, coordinada i cooperativa de tres sistemes: nerviós, endocrí i immunitari. Tots tres recullen l'estat fisiològic general de l'organisme, l'ambient que l'envolta i actuen en conseqüència per tal d'assegurar una resposta adequada de l'organisme davant d'una situació o estímul, i així garantir la seva supervivència.

Les múltiples funcions que desenvolupa el sistema immunitari es podrien resumir en reconèixer i discernir el que és propi d'allò que és estrany (ja sigui no propi o propi alterat). Aquesta capacitat ha estat crítica al llarg de l'evolució, perquè ha evitat el canibalisme (p. ex., la fagocitosi entre membres d'una mateixa espècie) i, a més, ha permès la compatibilitat sexual i la defensa envers agressions externes. El sistema immunitari és clau en el control i l'eliminació de potencials infeccions causades per agents patogènics. Diàriament un organisme està exposat a multitud de compostos i microorganismes estranys a ell. La majoria són detectats i eliminats en poques hores gràcies a la **resposta innata**, que és el resultat d'una cascada de múltiples i convergents esdeveniments que donen lloc a l'eliminació de la senyal que l'ha activada. Si un agent infecciós és capaç de superar l'acció de la resposta més primerenca, els vertebrats presenten una segona línia de defensa, anomenada **resposta adaptativa** o **específica**. Aquesta resposta es caracteritza per la generació i/o ampliació clonal de dos tipus cel·lulars: Les cèl·lules efectores, que actuen específicament contra un antigen del patogen, i les cèl·lules de memòria que protegeixen l'animal de futures infeccions per un agent que presenti el mateix antigen patogènic. Pels motius abans exposats, és clar que la capacitat del sistema immunitari de reconèixer patrons moleculars propis de la mateixa espècie, envers agents exògens potencialment patogènics, és crític per a la supervivència de l'espècie (Du Pasquier 2001).

Històricament el sistema immunitari ha estat el més desconegut dels tres sistemes encarregats de l'homeòstasi. El descobriment del reconeixement antigen anticòs i la seva aplicació en vacunes va marcar l'inici d'una progressió exponencial en el camp de la immunologia. En els darrers anys, però, s'ha vist que el paper de la resposta innata s'havia subestimat, i per això actualment són molts els esforços que s'estan invertint per aprofundir en el seu coneixement.

1.1. Immunitat innata

Aproximadament el 90% de les espècies animals no tenen resposta adaptativa, tot i que aquestes han prosperat durant milions d'anys en un món farcit de microorganismes. Si bé és cert que la resposta adaptativa dona un avantatge competitiu als vertebrats, també ho és que la majoria d'agressions que un organisme pateix se superen sense necessitat que la resposta específica hi intervingui.

L'expansió clonal de la resposta adaptativa requereix de 4 a 7 dies. En aquest període la immunitat innata és clau per controlar el procés infecció en les seves etapes més primerenques. I, a més, també modularà el tipus de resposta específica que es vertebrarà a partir de la primera resposta. Així es diu que la immunitat innata predisposa a l'adaptativa per organitzar una resposta el més adequada possible al tipus d'infecció que es presenti. Per tal de realitzar aquesta doble funció, la immunitat innata dels vertebrats estableix tres estratègies de reconeixement de les agressions externes: el reconeixement del que és "forani i infecció", el reconeixement del que és "propi i absent" i, finalment, del que és "propi i alterat o induït" (Medzhitov and Janeway 2002).

El **reconeixement del "forani i infecció"** es basa en la capacitat per reconèixer productes conservats del metabolisme microbià que siguin exclusius dels microorganismes i alhora que no són produïts per l'hoste. Aquesta estratègia permet al sistema immunitari innat discriminar el que és propi del

que és estrany i infecció. Per tal de realitzar el reconeixement esmentat, la resposta innata detecta patrons moleculars conservats, que són productes essencials de la fisiologia microbiana (Janeway and Medzhitov 2002).

La segona estratègia, el **reconeixement del "propi i absent"**, depèn de la detecció de "marcadors del propi, normal". Les molècules del complex major d'histocompatibilitat de classe I (MHC-I) compleixen els requisits per actuar com aquest tipus de marcadors: estan expressades de forma constitutiva en totes les cèl·lules de l'organisme i, sovint, la seva expressió disminueix o desapareix a causa de l'acció d'un agent viral o de la transformació cel·lular. El seu reconeixement està associat amb diverses vies d'inhibició que bloquegen el desencadenament de respostes immunitàries contra el que és propi i normal. També els productes gènics i vies metabòliques que són exclusives de l'hoste, i, per tant, inexistents en els microorganismes, són emprats com a marcadors de patrons que són propis i normals en l'hoste (Mushegian and Medzhitov 2001). En situacions normals, els marcadors s'expressen constitutivament en les cèl·lules de l'hoste i interaccionen amb receptors inhibidors, que eviten –entre d'altres–: la fagocitosis per part de macròfags o la lisi per part de *natural killers* (NK) o del complement, de les cèl·lules sanes de l'hoste.

La tercera estratègia, el **reconeixement del "propi i alterat"**, consisteix en la detecció de "marcadors d'allò propi però anormal" que s'indueixen durant una infecció vírica, una transformació cel·lular o un estrès excessiu. Els marcadors per aquest tipus de reconeixement senyalitzen al sistema immunitari, principalment a les *natural killers* (NK), quines cèl·lules es troben afectades i cal eliminar (Medzhitov and Janeway 2002).

Totes aquestes estratègies juguen un paper important en la defensa innata dels vertebrats, però la més emprada i que reconeix un major número de dianes és el reconeixement de **"l'estrany i infecció"**. Aquesta estratègia ha estat conservada durant milions d'anys d'evolució i és present des d'organismes molt primitius fins als vertebrats superiors (Mushegian and Medzhitov 2001).

1.1.1. Els epitelis: Barreres naturals contra les infeccions

La pell i els epitelis que recobreixen els aparells respiratori, digestiu i genitourinari són la primera línia de defensa davant els agents patogènics. La continuïtat dels epitelis constitueix una barrera excepcional contra possibles penetracions de macromolècules i microorganismes potencialment perjudicials. Per tant, la seva integritat és bàsica per garantir l'homeòstasi de l'organisme. Aquesta s'estableix mitjançant la participació de diversos tipus d'unions entre cèl·lules adjacents, i entre les cèl·lules epitelials i la matriu de teixit connectiu que les suporta.

Els epitelis que recobreixen els tractes no presenten una organització única, sinó que n'hi ha de diversos tipus, segons el nombre de capes cel·lulars i la forma de les cèl·lules superficials. L'epiteli cilíndric simple, per exemple, és propi de la mucosa intestinal, mentre que l'epiteli pla estratificat es troba en la pell, la cavitat oral i l'esòfag. D'altres tractes, com les vies aèries, alternen epitelis simple o estratificat segons la zona analitzada. Finalment, l'epiteli de transició és un concepte, que definia una forma de transició entre l'epiteli pla estratificat i l'epiteli cilíndric, típic de la histologia d'òrgans buits i sotmesos a grans variacions de volum (com és el cas de la bufeta urinària i l'úter).

La majoria de processos infecciosos s'estableixen a les mucoses i no pas a la pell, que mostra una gran eficàcia antiinfecciosa gràcies, entre d'altres factors, al seu pH lleugerament àcid i a la sequedat que ella mateixa genera activament. Les mucoses tenen la difícil tasca de protegir l'organisme en ambients densament poblats per microorganismes, alguns dels quals han desenvolupat estratègies eficaces per colonitzar-los i envair els teixits subjacents. Amb l'objectiu d'evitar la seva infecció, les mucoses organitzen una acció induïda per un complex sistema de factors capaços de mediar activitats microbiostàtiques i microbicides, pròpies de la immunitat innata i adaptativa. Els epitelis alerten de potencials infeccions i actuen sobre aquestes, reduint el seu abast (Wells, Rossi et al. 2011). Així doncs, els epitelis no són meres

barreres físiques, que passivament eviten l'entrada d'agents patògens, sinó que tenen un paper actiu en el sistema immunològic.

1.1.1.1. Mucines

Un dels mecanismes més rellevants de les mucoses és el mucus, però sovint la literatura no ha valorat adequadament la seva contribució a la defensa innata d'aquestes. El mucus és un gel viscoelàstic, secretat pels epitelis associats a les mucoses (Fig. 1). El mucus presenta una permeabilitat selectiva, la qual exclou patògens i toxines, alhora que permet l'entrada i sortida de nutrients, gasos i metabòlits. A més, el mucus té una vida mitja curta (minuts o hores) i posteriorment és eliminat o digerit i reciclat. L'elevada taxa de recanvi que presenta li confereix una eficaç acció protectora, en tant que reté i arrossegua els microbis. Tant el gruix i l'espessor, així com la composició de les secrecions mucoses difereixen en els diferents tractes i al llarg dels diferents segments dels mateixos (Fig. 2).

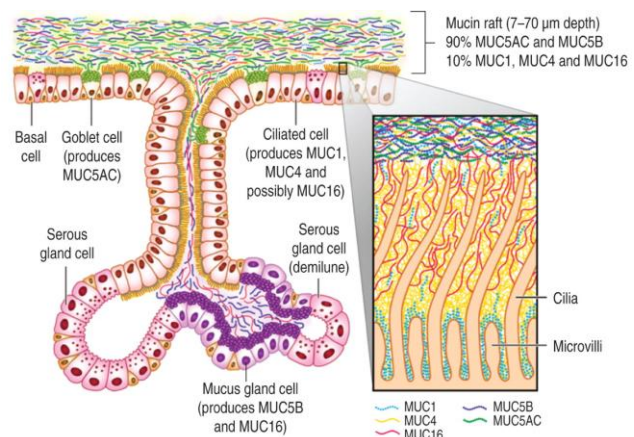


Figura 1. Mucines (MUC) sobre l'epiteli respiratori. L'epiteli de la via aèria troben tapissat de mucus. Com mostra la imatge, les mucines solubles situades sobre la superfície de les cèl·lules representen un 90% del total de mucines, MUC5AC i MUC5B, i un 10% estableixen contacte directe amb l'epiteli, MUC1, MUC4 i MUC16. La MUC1 es troba ancorada profundament entre els cilis i microvel·lusos. (R.M. du Bois and L. Richeldi. *Interstitial Lung Diseases*; European Respiratory Society Monograph, Vol. 46. 2009. P.47-66).

El mucus conté glicoproteïnes anomenades mucines, que són pèptids fibrosos llargs coberts per una varietat complexa d'oligosacàrids. Si bé és cert

que moltes proteïnes encaixen en aquesta definició, la seqüenciació a nivell de ADN del primer membre de la família (MUC1), el 1980, va suposar un gran salt endavant en la comprensió d'aquestes proteïnes i una descripció més acurada de les característiques que defineixen les mucines. Des d'aleshores, les mucines es distingeixen de les glicoproteïnes de tipus mucina per la redundància que presenta el seu esquelet proteic, que és caracteritzat per exhibir múltiples repeticions en tàndem d'un pèptid seqüència. Per exemple MUC5 es caracteritza

per presentar varies repeticions del motiu TTSAPTTs (Soudan, Tetaert et al. 1998). Totes les mucines descrites tenen aquesta característica comuna, independentment del grau de conservació del pèptid seqüència i del nombre de repeticions del mateix, que pot fluctuar segons el polimorfisme genètic. Tot i que aquest criteri estructural hauria d'aclarir la definició de mucina, aquest concepte encara resta obert i és motiu de debat. Aquest fet es deu a l'existència d'isoformes generades per *splicing* alternatiu, que no presenten el domini comú i repetitiu i per tant recorden a una glicoproteïna de membrana tipus mucina, com és el cas de MUC1/Y (Hanisch and Muller 2000).

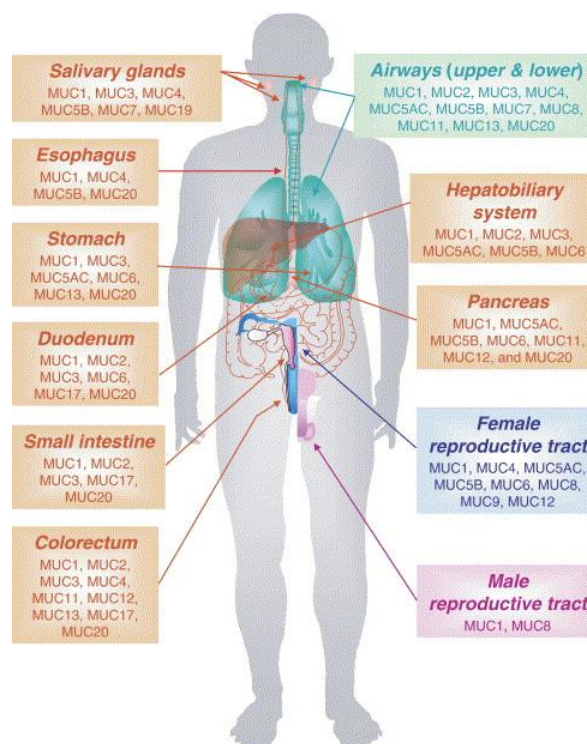


Figura 2. Distribució espacial de les mucines al cos humà. Les mucines són produïdes per una gran varietat de teixits epitelials. Els diferents tipus de mucines que s'expressen en condicions fisiològiques normals en els principals tractes s'il·lustren emprant diferents colors per cada aparell: digestiu, respiratori i reproductor. (Mahefatiana Andrianifahanana. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases 2006).

Actualment coexisteixen dos definicions pel terme mucina, ambdós fan referència a característiques estructurals: La primera estableix, com a característica comuna per a totes les mucines, la presència de repeticions del domini junt amb espesses O-glicosilacions. La segona estableix que tota proteïna amb O-glicosilacions unides a repeticions de serines i treonines es pot considerar una mucina.

El nombre de mucines va augmentant paral·lelament amb els esforços invertits

per conèixer millor les diferents propietats que presenten i les permeten participar en diversos processos biològics, des de la defensa innata fins al càncer.

1.1.2. Reconeixement dels patògens: receptor reconeixedor de patògens i els seus lligands

El reconeixement de "l'estrany i infeccions" és un dels punts clau en la defensa de qualsevol organisme. Per aquest motiu, com ja s'ha introduït anteriorment, aquest tipus de reconeixement s'ha seleccionat positivament al llarg de tota l'escala evolutiva gràcies a l'enorme sedàs que ha representat l'exposició constant a possibles patògens, en un planeta on tot ecosistema és cobert de microorganismes. Però la capacitat de reconèixer patògens està limitada d'una banda per l'enorme heterogenicitat que presenten els diferents grups potencialment patogènics i de l'altra per la seva elevada taxa de mutació. A més a més, a aquests dos factors cal afegir-hi la limitació del genoma per codificar receptors de la immunitat innata, que -a diferència de l'adaptativa- no realitza recombinació somàtica. Per tant, es pot dir que la defensa innata ha evolucionat fins a ser capaç de reconèixer amplis i diversos grups de molècules exògenes, mitjançant la utilització d'un nombre limitat de receptors i amb una especificitat estipulada de forma unívoca en el genoma. Aquests receptors s'anomenen "receptors reconeixedor de patrons" (***pattern recognition receptor, PRR***) i s'expressen en la superfície cel·lular, en compartiments intracel·lulars i en els líquids corporals. Els PRR es localitzen en punts estratègics on es produeix el primer contacte amb els patògens durant la infecció (Medzhitov and Janeway 1997). Els diferents tipus cel·lulars de la immunitat innata (tant d'epitelis com de cèl·lules hematopoètiques) comparteixen i exhibeixen un grup limitat de receptors, que interaccionen amb unes poques estructures moleculars conservades en grups molt grans de microorganismes, els anomenats "patrons moleculars associats a patògens" (***pathogen associated molecular pattern, PAMP***). Els PAMPs presenten

estructures químiques diverses, però comparteixen 3 característiques bàsiques:

- I. Són presents en els microorganismes, però no en els seus hostes, cosa que permet al sistema immunitari innat discriminar el que és endogen en l'organisme, del que és exogen.
- II. Són essencials per a la supervivència o patogenicitat dels microorganismes. Per tant, tot i que la defensa innata actui contra ells, no poden ser modificats pels seus portadors perquè això suposaria un efecte letal o reversió de la patogenicitat dels mateixos microbis.
- III. Són compartits per classes senceres de microorganismes i, per tant, han de respondre a patrons moleculars i no només a estructures particulars.

Els PAMPs no són exclusius dels patògens, sinó que també els produeix la flora saprofítica. Així, estructures com l'àcid lipoteicoic (LTA) i el lipopolisacàrid (LPS) són compartides per tots els bacteris gram-negatius i gram-positius, respectivament. A més, el peptidoglucà (PGN) es troba en totes les parets bacterianes, si bé els gram negatius –coberts de LPS- l'exposen menys. El motiu CpG no metilat es característic de l'àcid desoxirribonucleic (ADN) bacterià, però no de les cèl·lules eucariotes, i l'àcid ribonucleic (ARN) de doble cadena és també una característica exclusiva estructural dels virus d'ARN que no expressen els seus hostes. Pel que fa als fongs, els manans, els β -glucans i la quitina són components conservats de les seves parets, sent la quitina un PAMP expressat també per paràsits. Cap dels anteriors PAMPs citats es sintetitzen en l'hoste i alhora tots ells són presents en grans grups de potencials patògens i essencials per la seva fisiologia (Taula I).

Atès que els microbis no patogènics -flora saprofítica- també comparteixen algunes de les molècules considerades com a PAMPs (Fig. 3), s'ha suggerit que aquestes podrien ser descrites d'una manera més precisa com a "patrons moleculars associats a microbis" (***microbe-associated molecular patterns, MAMPs***) (Bittel and Robatzek 2007).

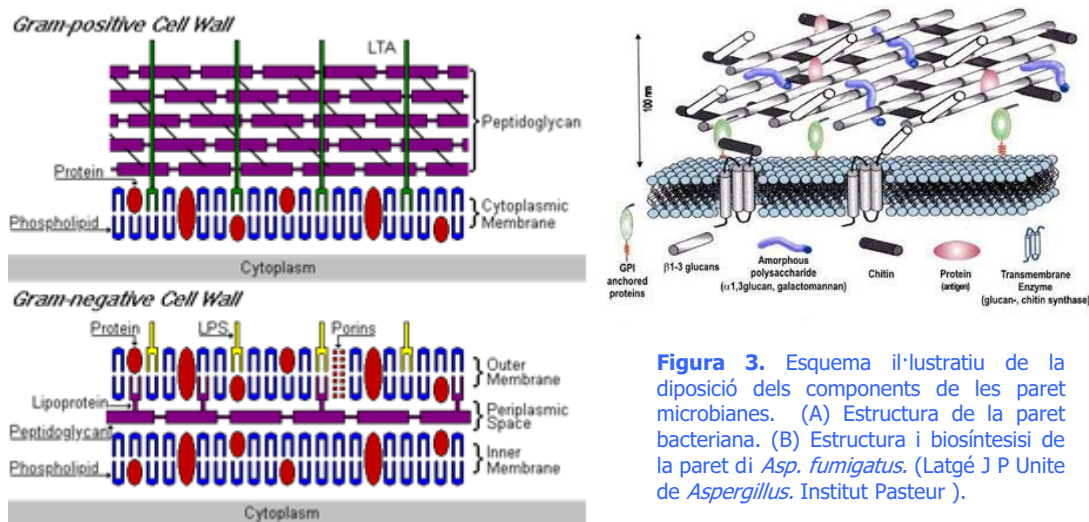


Figura 3. Esquema il·lustratiu de la diposició dels components de les paret microbianes. (A) Estructura de la paret bacteriana. (B) Estructura i biosíntesi de la paret de *Asp. fumigatus*. (Latgé J P Unite de *Aspergillus*. Institut Pasteur).

Més recentment, el terme "patró molecular associat a la virulència" (***virulence-associated molecular pattern, VAMP***) s'ha introduït per descriure aquells factors (per exemple, les toxines microbianes i la flagelina) que permeten a l'hoste discriminar els microbis patògens dels que no ho són (Miao and Warren 2010). Finalment, els factors endògens -com ara components nuclears o citosòlics, que s'alliberen durant l'estrès tissular o necrosi i que poden desencadenar respostes inflamatòries- han estat designats "patrons moleculars associats a perill" (***danger-associated molecular patterns, DAMPs***) (Seong and Matzinger 2004) (Vasta, Ahmed et al. 2012).

El reconeixement de PAMPs pels PRRs té com a resultat l'activació de diversos tipus de respostes immunitàries innates que sovint s'associen també a funcions efectores. Segons les funcions que realitzen i/o desencadenen, els PRRs es classifiquen en: secretats, endocítics i senyalitzadors. Els primers són alliberats com a molècules solubles i funcionen com opsonines, tot unint-se a les parets microbianes. Un exemple clàssic d'aquest grup són les lectines d'unió a manosa (*mannose binding lectin, MBL*), que s'uneixen als carbohidrats de les cobertes microbianes i inicien l'activació del complement. Els segons s'expressen a la superfície de macròfags i cèl·lules dendrítiques (DC) i promouen la fagocitosi dels patògens, com és el cas de Dectin-1 i SR-AI. Finalment, els PRRs de senyalització activen vies de transducció de senyal, que indueixen l'expressió de

diverses proteïnes que intervenen en la resposta immunitària, com per exemple les citocines. Dins aquest darrer grup trobem els *toll-like receptors* (TLR).

La presència, número i distribució dels PRR són característics de cada individu. **Cada organisme posseeix un repertori de PRR que actua com a carta de presentació davant l'ambient extern.** Així doncs, la combinació, quantitat i localització dels PRR condiciona la propensió d'un individu a desenvolupar un tipus de malaltia o un altre. Els PRR són el primer mecanisme de defensa per establir i preservar el delicat equilibri que fa possible l'homeòstasi.

1.2. El sistema immunitari i l'evolució

Estudiar l'evolució de la vida al planeta ha permès dibuixar l'arbre que descriu el procés d'especiació que ha originat totes les espècies vives i fòssils. Observant l'aparició i progressió de dominis proteics a espècies primitives d'aquest arbre, com les esponges, hom s'adona que quan la branca es va diversificar, donant lloc a noves espècies, moltes de les molècules clau per a l'establiment de la immunitat innata i adaptativa en vertebrats superiors ja existien. Per exemple, els sistemes de reconeixement de bacteris i fongs patogènics ja es trobaven en organismes tant primitius com les esponges. El seu sistema immunitari innat es basa en receptors en la superfície cel·lular que reconeixen un glicopolisacàrid, el $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucà de la paret dels fongs. Així doncs, molts dels mecanismes de defensa que es creia que eren propis i exclusius del sistema immunitari dels metazous més evolucionats, ara s'admet que s'han format gràcies a l'herència adquirida d'ancestres eucariotes (Dzik 2010). Mitjançant el reclutament de molècules o vies de senyalització primerenques, que tenien un paper en processos fisiològics i/o del desenvolupament, els PRR es van originar en organismes primitius i han evolucionat fins a l'actualitat. És molt probable que aquestes molècules adquirissin una funció dual durant la seva evolució, actuant primer com a

receptors d'adhesió o factors de creixement i posteriorment com a molècules immunitàries, requerides pel reconeixement d'allò propi envers l'estrany.

Al llarg de l'evolució diversos mecanismes, com la duplicació gènica i el *shuffling* d'exons (Ponting and Russell 2002), han innovat, enriquit i/o perfeccionat vies de senyalització i mecanismes efectors, gràcies a la selecció darwinina que es dona a tots els nivells, macro i micro, de la biologia (Dzik 2010).

En resum, la immunitat no és el resultat d'una adquisició recent dels organismes superiors -com es creia fa uns anys-, sinó que els seus orígens estan arrelats profundament en la història evolutiva de tots els organismes. Existeixen diversos tipus PRRs, els quals estan implicats en la identificació de lligands exògens, els PAMPs. L'origen dels PRRs es troba en organismes primitius, a partir de vies primerenques de reclutament de molècules o de senyalització que tenien un paper en processos fisiològics i/o del desenvolupament. Posteriorment, els PRRs han anat evolucionant fins a l'actualitat (Dzik 2010). A dia d'avui, s'han descrit diversos grups, que amb els anys és ben possible que augmentin, donat que és un camp en constant evolució i relativament nou. Entre els grups amb un origen evolutiu diferent trobem els **TLRs, receptors reconeixadors de carbohidrats (RRCs) i receptors scavenger rics en cisteïna (SRCRs)**, tots ells capaços de reconèixer lligands exògens (microbians) i endògens.

2. Els receptors TLR (*Toll-like receptors*)

El receptor Toll de *Drosophila sp.* es va identificar en un primer moment com una molècula clau per definir la polaritat dorso-ventral en el desenvolupament embrionari de l'insecte. Posteriorment, es va demostrar que també era un component crític per a la immunitat antifúngica de *Drosophila sp.* A partir d'aquest descobriment es van identificar molts altres receptors similars involucrats en la defensa antiinfecciosa en plantes, insectes i vertebrats, inclosos els mamífers. Les proteïnes homòlogues al receptor Toll de *Drosophila*

sp. se'ls va anomenar receptors *Toll-like* o TLRs. Els TLRs van ser els primers PRRs identificats, són també els receptors més ben caracteritzats i reconeixen una àmplia gama de PAMPs.

Els TLRs són glicoproteïnes transmembrana de tipus I i presenten un ectodomini, que conté entre 16 i 28 repeticions riques en leucina (***Leucine-rich repeat, LRR***) que intervenen en el reconeixement dels PAMPs. A més també tenen una regió transmembrana i una citosòlica amb dominis **Toll-Interleucina-1 receptor (TIR)** dominis, que activen vies de senyalització intracel·lulars (Mushegian and Medzhitov 2001). Els TLR es localitzen tant en la superfície cel·lular en les vesícules intracitoplasmàtiques i presenten una distribució cel·lular amplíssima. Els TLR són expressats per epitelis (per exemple, són molt estudiats en tracte gastrointestinal), per cèl·lules de la immunitat innata (DC i macròfags, entre d'altres) i adaptativa (limfòcits B) (Kawai and Akira 2011).

A dia d'avui s'han identificat 10 i 12 membres funcionals de la família dels TLRs en humans i ratolins, respectivament. Cada TLR detecta PAMPs diferents derivats de virus, bacteris, fongs i paràsits. Els PAMPs reconeguts pels TLRs inclouen: lipoproteïnes (reconegudes per TLR1, TLR2 i TLR6), RNA de doble cadena (ds) RNA (TLR3), lipopolisacàrids (LPS) (TLR4), flagelina (TLR5), RNA de cadena senzilla (ss) (TLR7 i TLR8), i DNA (TLR9) (Taula I) (Janeway and Medzhitov 2002). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 es localitzen a la superfície cel·lular i s'uneixen a components de la paret microbiana, mentre que TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 s'expressen dins de vesícules intracitoplasmàtiques i reconeixen els àcids nucleics. Recentment, s'ha descrit l'existència de TLR11, un nou membre murí similar a TLR5 que s'expressa en la superfície cel·lular i també en els compartiments intracel·lulars. TLR13 s'expressa també en les vesícules intracel·lulars, si bé encara no ha estat identificat quin és el seu PAMP diana. Els compartiments intracel·lulars, on TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 es troben, en les DC i altres cèl·lules de la immunitat innata inclouen el reticle endoplasmàtic (ER), endosomes, lisosomes i endolisosomes. La localització

intracel·lular permet als TLRs reconèixer els àcids nucleics subministrats als compartiments intracel·lulars després de l'absorció dels virus i altres agents patògens o de cèl·lules infectades. Per contra, els àcids nucleics cel·lulars presents en el medi extracel·lular es degraden ràpidament per les nucleases, de manera que no arriben a accedir a les vesícules intracel·lulars. Per tant, la localització intracel·lular és de gran rellevància per evitar el contacte amb els àcids nucleics del propi organisme, la qual cosa podria desencadenar l'aparició de malalties autoimmunes. TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 són retinguts a l'ER i es lliuren als endosomes (on els TLR es trobaran amb els seus respectiu PAMPs) a través de l'aparell de Golgi (Kawai and Akira 2011).

Species	PAMPs	TLR Usage	PRRs Involved in Recognition
Bacteria, mycobacteria	LPS	TLR4	
	lipoproteins, LTA, PGN, lipoarabinomannan	TLR2/1, TLR2/6	NOD1, NOD2, NALP3, NALP1
	flagellin	TLR5	IPAF, NAIP5
	DNA	TLR9	AIM2
	RNA	TLR7	NALP3
Viruses	DNA	TLR9	AIM2, DAI, IFI16
	RNA	TLR3, TLR7, TLR8	RIG-I, MDA5, NALP3
	structural protein	TLR2, TLR4	
Fungus	zymosan, β -glucan	TLR2, TLR6	Dectin-1, NALP3
	Mannan	TLR2, TLR4	
	DNA	TLR9	
	RNA	TLR7	
Parasites	tGPI-mutin (<i>Trypanosoma</i>)	TLR2	
	glycoinositolphospholipids (<i>Trypanosoma</i>)	TLR4	
	DNA	TLR9	
	hemozoin (<i>Plasmodium</i>)	TLR9	NALP3
	profilin-like molecule (<i>Toxoplasma gondii</i>)	TLR11	

Taula I. A. Tipus de PAMPs i espècie originària i detecció dels PAMPs per part dels diferents TLRs.

El paper dels TLR en mamífers es restringeix a la resposta immunitària cel·lular, mentre que en *Drosophila sp.* presenta, com s'ha dit, una funció dual. En la mosca l'expressió de Toll segueix un complex patró que depèn tant del teixit com de l'estadi del desenvolupament en que es troba l'organisme. Es creu que els TLR de mamífers i artròpodes tenen un ancestre comú, el qual va derivar de manera independent en els dos grups, establint funcions exclusivament defensives en organismes superiors. Tot i la deriva evolutiva, el mecanisme de senyalització dels TLR, mitjançant el domini TIR, està altament conservat al llarg de l'escala evolutiva. En canvi, allò que és propi dels TLR de mamífers és el mecanisme de reconeixement dels PAMPs. Contràriament al que succeeix en

d'altres grups, com els insectes, els TLR dels mamífers interaccionen directament amb els PAMPs, mitjançant els dominis extracel·lulars LRR (Kawai and Akira 2011). A partir del reconeixement dels respectius PAMPs, un TLR recluta un conjunt específic de molècules adaptadores que s'anclen al receptor pel domini TIR, com MyD88 i TRIF. El motiu TIR és el domini més conservat dels TLR, es troba fins i tot en esponges. El reclutament d'adaptadors pel domini TIR desencadena la cascada de senyalització, que culmina amb l'activació dels factors de transcripció NF- κ B (Fig. 4) (Dzik 2010). Al seu torn, l'activació de la via NF- κ B condueix a la secreció de citocines inflamatòries, IFN de tipus I, quimiocines i pèptids antimicrobians. Aquestes respostes promouen el reclutament de neutròfils, l'activació de macròfags i la inducció de gens estimulats per IFN. Finalment i gràcies a l'acció conjunta dels diferents processos esmentats, l'eliminació directa dels patògens es produirà. D'altra banda, l'activació de la senyalització de TLR condueix a la maduració de les DC, contribuint així a la inducció de la immunitat adaptativa. Cal destacar que les respostes cel·lulars induïdes a conseqüència de l'activació dels TLR acostumen a diferir en les diferents cèl·lules

de la immunitat innata, cosa que reflexa la seva particular fisiologia. Es conclou, per tant, que els **TLR juguen un paper central en el reconeixement de la cèl·lula hoste i en la**

resposta contra patògens.

Segons el nombre de repetició de LRRs i els motius dels dos

grups de cisteïnes que flanquegen les LRRs, els TLRs es poden dividir en sis grans famílies. **TLR2**, juntament amb TLR1, TLR6, i TLR10, són membres de la subfamília TLR1 (Oliveira-Nascimento, Massari et al. 2012). El reconeixement lligand-específic i la senyalització a través de TLR2 es produeix a través de

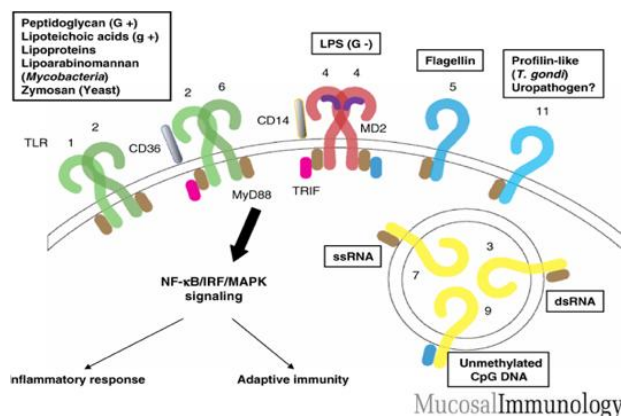


Figura 4. Els receptors tipus Toll. TLRs estan implicats en el reconeixement de patrons microbians tant a la membrana plasmàtica i en els compartiments intracel·lulars. Després del lligament, els TLR dimeritzen i transmeten senyals a través de la cèl·lula a través de molècules adaptadores com ara MyD88 i TRIF. *Mucosal Immunology* ©.

l'heterodimerització amb TLR1 o TLR6. Es creu que els heterodímers TLR2/TLR1 i TLR2/TLR6 són preformats en la superfície cel·lular. S'ha proposat que en absència de TLR1 i/o TLR6, TLR2 homodimeritzaria, però amb les actuals tècniques aquest punt no s'ha pogut confirmar. Estudis cristal·logràfics dels dos heterodímers han permès determinar que els mòduls LRRs dels ectodomini confereix una estructura amb forma de ferradura, de manera que cada heterodímer dona lloc a una forma en "m". Finalment, el complex d'heterodímers s'estabilitzaria gràcies a la interacció amb el seu lligand (Oliveira-Nascimento, Massari et al. 2012).

Com ja s'ha dit, les superfícies epitelials ofereixen la primera línia de defensa contra la infecció, per tant no és estrany que siguin llocs amb una gran expressió de TLRs. En el ronyó, els TLRs (principalment TLR2 i TLR4) s'expressen constitutivament en les cèl·lules epitelials renals, incloent les cèl·lules de la càpsula de Bowman, túbuls proximals i distals, el tracte urinari inferior i la bufeta. La seva expressió augmenta en resposta a la inflamació i diverses funcions potencials de TLR s'han proposat en la inflamació renal (Tipping 2006).

Per tot això hi ha la convicció que, en el futur, els TLRs poden proporcionar dianes útils per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques en malalties inflamatòries, on l'activació en la interfície immunitat innata i adaptativa és crítica (Tipping 2006).

3. Receptors reconeixadors de carbohidrats

Un dels grups de PRRs més gran és el que reconeix PAMPs de tipus carbohidrat. Aquest reconeixement s'efectua mitjançant un domini d'unió a carbohidrats (***carbohydrate-recognition domain, CRD***). Els receptors reconeixadors de carbohidrats (RRC) engloben diverses famílies de proteïnes. Un criteri senzill i clar per estudiar els RRC és el de dividir els receptors entre solubles i de membrana.

3.1. RRC solubles

3.1.1. Colectines: MBL, SP-A i SP-D

MBL i les proteïnes surfactants A (SP-A) i D (SP-D) són membres de la família de les colectines (Epstein, Eichbaum et al. 1996; Holmskov 2000), que ahora pertanyen a la superfamília de lectines dependents de calci i es caracteritzen per presentar un domini CRD. Estructuralment les colectines es caracteritzen per ser polipèptids amb quatre regions ben definides. En primer lloc, l'extrem N-terminal, d'uns 7-28 residus aminoacídics, conté d'un a tres residus de cisteïna; seguidament, un domini de tipus col·lagen, d'uns 53-177 a.a, caracteritzada per la repetició del motiu (Gly-Xaa-Yaa)_n, aquesta regió connecta amb l'extrem C-terminal, on se situa el CRD, mitjançant un coll amb conformació d' α -hèlix, d' aproximadament 24 aa. Les colectines tenen la capacitat d'oligomeritzar, fet que es va descobrir tot analitzant la mobilitat d'aquestes proteïnes en gels de SDS-PAGE sota condicions no reductores (Holmskov 2000). Així doncs, l'estructura terciària revela que els polipèptids trimeritzen, de manera que les seves regions tipus col·lagen donen lloc a una triple hèlix. A més, les cisteïnes dels seus extrems N-terminal estableixen enllaços disulfur que ajuden a mantenir l'estructura terciària. En un nivell conformacional superior, diversos trímers poden establir enllaços disulfur addicionals i agregar entre ells, formant hexàmers en les MBL i la proteïna surfactant A (SP-A) i tetràmers en la SP-D.

Les colectines actuen com a opsonines, unint-se a un ventall ampli de sacàrids com la manosa, fucosa, glucosa, maltosa, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc o NAG) i N-acetil-D-manosamina (ManNAc); ara bé, cada colectina presenta una major afinitat per uns lligands que per uns altres. El domini amb activitat lectina de les colines es pot classificar, segons la seva composició, en dos tipus que determinen quin és el lligand preferencial. El primer, només present en SP-A, exposa el motiu Glu-Pro-Asp que reconeix galactosa (Gal) i N-acetilgalactosamina (GalNAc). Mentre que la resta de colectines s'uneixen a manosa i presenten el motiu Glu-Pro-Asn.

La unió de les colectines als seus lligands també es modula gràcies a la capacitat d'oligomeritzar i d'agregar. L'estructura terciària permet disposar els dominis CRD molt a prop els uns dels altres, això implica un increment de l'afinitat pels oligosacàrids. Aquest augment pot ser de diversos ordres de magnitud quan els trímers agreguen. Altres conseqüències derivades de l'agrupació de les colines són: d'una banda que aquestes **només s'uniran a disposicions denses i repetitives de sacàrids, tret típic de les cobertes microbianes de bacteris i fongs**. I de l'altra, **la formació d'una superfície de contacte extensa per a les molècules efectores**. Per tant, tant la composició del domini, com la disposició en l'espai actuen sinèrgicament en les colectines donant lloc al reconeixement d'un gran nombre de espècies bacterianes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*), fúngiques (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* i *Cryptococcus neoformans* acapsulat) i virals (VIH-I, IAV i RSV rotavirus). L'ampli ventall de microbis reconeguts per les colectines il·lustra fins a quin punt són importants en la defensa innata contra patògens.

El reconeixement dels lligands de les colectines mitjançant el domini lectina, desencadena una doble funció: en primer lloc, en agregar els microorganismes impedeixen la seva proliferació i, en segon lloc, promouen l'eliminació dels microorganismes tot activant la fagocitosi i la cascada del complement (només en el cas de MBL; SP-A o SP-D no activen complement) (Holmskov 2000).

MBL es produeix al fetge i activa la cascada del complement acomplexant-se amb dues serinproteses (MASP1 i MASP2) que activen els factors C2 i C4 del complement o bé directament C3 (Feizi 2000) (Fig. 5). Aquesta via d'activació del complement, anomenada "via de les lectines", només s'inicia per la interacció MBL-MASP i és evolutivament anterior a les vies clàssica i alternativa de l'activació del complement (Gadjeva, Thiel et al. 2001). Deficiències genètiques de les MBL s'associen amb un millor pronòstic, després d'un accident cerebrovascular agut en ratolins i éssers humans a susceptibilitat

augmentada a patir certes infeccions i malalties autoimmunitàries però també a protecció enfront dany tisular per isquèmia/reperfusió (Cervera, Planas et al. 2010).

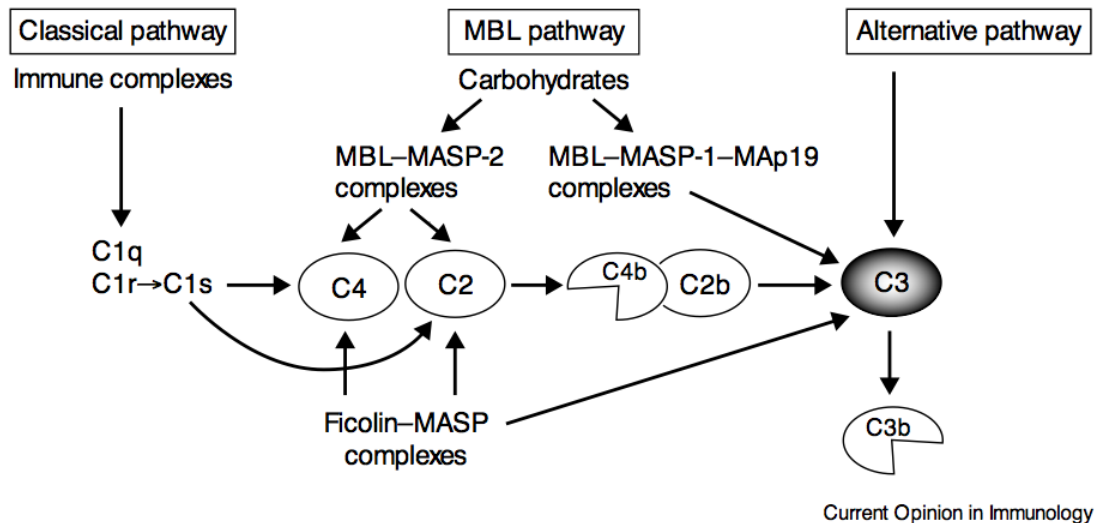


Figura 5. Esquema de la via d'activació del complement centrat en la via de les Lectines (Gadjeva, M., S. Thiel, et al. 2001).

En un primer moment, **SP-A** i **SP-D** es van descriure com a components de l'homeòstasi del surfactant extracel·lular pulmonar, que evita el col·lapse dels alvèols. Posteriorment s'ha vist que el seu rol més destacat és en la resposta immunitària innata contra els microorganismes (Holmskov 2000). Aquestes colectines se sintetitzen principalment en les cèl·lules alveolars de tipus II i en les epitelials bronquials, per bé que també s'ha detectat la seva producció fora del pulmó (Holmskov 2000). SP-A i SP-D tenen importants funcions immunomoduladores perquè promouen la fagocitosis i l'eliminació de microorganismes per part dels macròfags, el reclutament i l'activació de les cèl·lules del sistema immunitari, a més de modular la producció de citocines (Holmskov 2000).

3.1.2. Ficolines

Les ficolines són considerades lectines, si bé el calci no intervé directament en la unió amb els carbohidrats, i comparteixen moltes

característiques estructurals i funcionals amb les colectines (també s'uneixen a MASPs i activen el complement). S'ha vist que les ficolines presenten un extrem N-terminal amb cisteïnes, una regió central amb domini de tipus col·lagen i en l'extrem C-terminal es troba un domini de tipus fibrinogen. Aquest domini globular és el responsable de reconeixement dels seus lligands, mentre que la regió de tipus col·làgena ofereix un punt d'ancoratge a efectors del sistema immunitari. L'estructura proposada és la d'una triple hèlix, que alhora pot agrupar-se formant un tetràmer, com és el cas de la ficolina L. La majoria de ficolines s'uneixen a grups sacàrids N-acetilats, que es troben per exemple en GlcNAc; per bé que reconeixen un ampli espectre de carbohidrats, fet que els permet reconèixer un gran nombre d'espècies microbianes, com succeeix amb les colines (Garlatti, Martin et al. 2010).

L'expressió de les ficolines depèn del teixit, el que suggereix que tenen una funció tissular específica. La localització i concentració de les ficolines difereix en els fluids extracel·lulars. En els humans trobem tres tipus de ficolines: la ficolina L i la ficolina H, que són sèriques, i la ficolina M, que s'expressa en leucocits, pulmó i melsa (Matsushita 2012).

L'estructura de la **ficolina L/P35/ficolina 2** dona lloc a un tetràmer constituït per quatre triples hèlixs, amb un total de dotze subunitats. La ficolina L és secretada pel fetge i s'uneix a *Salmonella typhimurium* TV119, *Escherichia coli*, diversos serotipus capsulats de *Staphylococcus aureus* i de *Staphylococcus pneumoniae* (Matsushita 2010).

La **ficolinaH/ antigen Hakata/ ficolina 3** es va identificar per primer cop com a un antigen del sèrum reconegut per un autoanticòs present en pacients amb lupus eritomatós. És un oligòmer que dona lloc a més de 10 bandes quan s'analitza en condicions no reductores mitjançant SDS-PAGE. Per tant, es creu que forma una barreja d'oligòmers de diferents mides. Es produeix en les cèl·lules dels epitelis del conducte biliar i en els hepatòcits, i posteriorment se secreta a la bilis i al sèrum. També es sintetitza en els pulmons, concretament

en les cèl·lules ciliades dels epitelis bronquials i en els alvèols tipus II, que les secreten als broquis i alvèols (Akaiwa, Yae et al. 1999). S'ha descrit que la ficolina 3 no s'uneix a manosa, però en canvi, reconeix lactosa, fucosa, NAcGal i NAcGlc. Aquesta última, però, amb menor afinitat que la ficolina 2. Finalment, s'ha vist que pot jugar un paper en la defensa contra de *S. typhimurium*, *Salmonella Minnesota* i *E. coli* (O111) (Matsushita and Fujita 2002).

La **ficolina M/ ficolina 1** es localitza en els grànuls del citoplasma de neutròfils, monòcits i cèl·lules alveolars tipus II, cosa que va suggerir que la ficolina M era també una ficolina de secreció (Liu, Endo et al. 2005). Recentment aquesta suposició s'ha confirmat en detectar-ne a baixos nivells en el plasma (Honore, Rorvig et al. 2008). La ficolina M també té afinitat per NAcGlc, NAcGal, a més d'àcid siàlic, i reconeix diversos bacteris com per exemple *S. aureus* i *S. typhimurium* LT2.

Comparant la capacitat d'activar la via del complement de les ficolines amb la de la MBL, s'estableix que la ficolina H és la que té major capacitat d'activació. Mentre, la ficolina L mostra una capacitat similar a la MBL i la ficolina M té el menor potencial d'activació del complement. Paral·lelament, les ficolines també tindrien un paper com a opsonines. Concretament, la ficolina L és capaç de multiplicar la fagocitosi dels neutròfils exposats a *S. typhimurium*. Addicionalment, la unió de ficolines sèriques a cèl·lules apoptòtiques activa el complement. Per tant, a més del seu paper en la immunitat innata, les ficolines també actuarien com opsonines en processos d'apoptosi (Matsushita 2010).

3.1.2.1. Ficoline no humanes

Si es té en compte que l'aparició de la immunitat innata s'arrela profundament en la història de l'evolució, no ha de sorprendre que les seves molècules siguin presents en diferents espècies animals, com és el cas de les ficolines. S'ha proposat que les ficolines A i B del ratolí són de fet homòlogues a les ficolines humanes L i M, respectivament. L'homòleg murí de la ficolina H correspondria a un pseudogen situat en el mateix cromosoma que les altres.

Reforçant la idea que les ficolines A i B són homòlogues a les humanes, s'ha observat que la ficolina A activa el complement en ratolins, mitjançant la seva unió amb MASP-2 i sMAP. Aquest fet implicaria que la ficolina A murina actua en la via de les lectines, com ho fan les humanes L i H. Mentre, la funció de la ficolina B roman desconeguda, tot i que l'observació que és capaç d'agregar *S. aureus* permet especular si podria augmentar la fagocitosi en macròfags (Endo, Matsushita et al. 2007).

En conjunt, les **ficolines i colectines tenen una funció destacada en la immunitat innata, activant la via del complement i la fagocitosi**. Si, a més, es té en compte la seva participació en processos de mort cel·lular, cal entendre que aquest grup de proteïnes és responsable, en els sentit més ampli del mot, de l'homeòstasi de l'organisme.

3.1.3. Galectines

Les Galectines són un família de lectines que es caracteritzen per la seva afinitat per a β -galactòsids i per presentar una seqüència consens en el seu CDR (Cooper 2002). Les galectines estan molt conservades estructuralment i filogenèticament, es troben àmpliament distribuïdes en els organismes eucariotes des de les esponges i els fongs fins als invertebrats i vertebrats (Cooper 2002). Basant-se en la seva organització, les galectines clàssicament s'han classificat en tres grups: prototípiques, quimera i repeticions en tàndem (Fig. 6). Les prototípiques (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 i -15) contenen un CRD per subunitat i estableixen homodímers mitjançant unions no-covalents. La galectina quimera (galectina-3) té en el seu extrem C-terminal el CRD i en el N-terminal un domini ric en prolines i glicines, que permet formar pentàmers. Finalment, les anomenades repeticions en tàndem (galectina-4, -6, -9 i -12) disposen dos CRD enllaçats per un pèptid. En solució, les galectines poden formar espècies multivalents en equilibri de manera concentració-depenent (Morris, Ahmad et al. 2004). L'oligomerització de les galectines i la conseqüent agrupació dels seus CRD permet unir i entrellaçar glicoproteïnes i

glicolípidis multivalents en la superfície cel·lulars, de manera que promouen la formació de microdominis que són senyals per a vies específiques on estan involucrats glucans i galectines.

Les galectines es troben tant en el citosol de les cèl·lules com en l'espai extracel·lulars, però no presenten pèptid senyal. Es creu són dirigides a l'exterior a través d'un mecanisme de secreció no clàssic. Així, la localització tissular i subcel·lular d'aquestes lectines resulta en una compartimentarització que influeix en l'oligomerització que, al seu torn, modula la unió selectiva als seus lligands (Greenspan 2001).

Des de que es van descriure per primer cop, s'ha considerat que les galectines medien en processos de desenvolupament i càncer en unir-se a glucans propis de l'hoste (endògens). Però en els darrers anys, diversos estudis han desvetllat que **les galectines estan involucrades en diversos efectes sobre la resposta innata i l'adaptativa que regularien l'homeòstasi immune.** Recentment, s'ha evidenciat que les galectines també són capaces d'interaccionar amb glucans no propis (exògens) sobre la superfície de bacteris, fongs i paràsits, actuant per tant com a PRR. Això ha trencat la visió més simplista que es tenia de les galectines, per donar lloc a un model més complex en el qual **les galectines reconeixen tan motius endògens com exògens, mitjançant el mateix lloc d'unió. El reconeixement és específic en ambdós casos, però és condicionat per la concentració i oligomerització locals de les galectines i també per la presentació geomètrica dels lligands oligosacàrids multivalents de l'hoste o del patogen.** És per aquest motiu que la concentració (que modula l'associació) de les galectines és crítica per la seva funcionalitat, com també ho és la seva localització (Vasta, Ahmed et al. 2012).

Se sap que alguns patògens es valen de les galectines per evadir la resposta immunitària (com succeeix amb el VIH-1, transmès sexualment, que utilitza la unió a galectina-1 per infectar l'hoste) (Ouellet, Mercier et al. 2005), tot

mimetitzar els patrons de glicosilació propis de l'hoste (procés conegut com a “*Red Queen effect*”), actuant així com un cavall de Troia (Vasta, Ahmed et al. 2012). El fet que alguns patògens utilitzin les galectines per interferir en l'acció del sistema immunitari, posa de relleu fins a quin punt les galectines poden ser rellevants en la resposta innata.

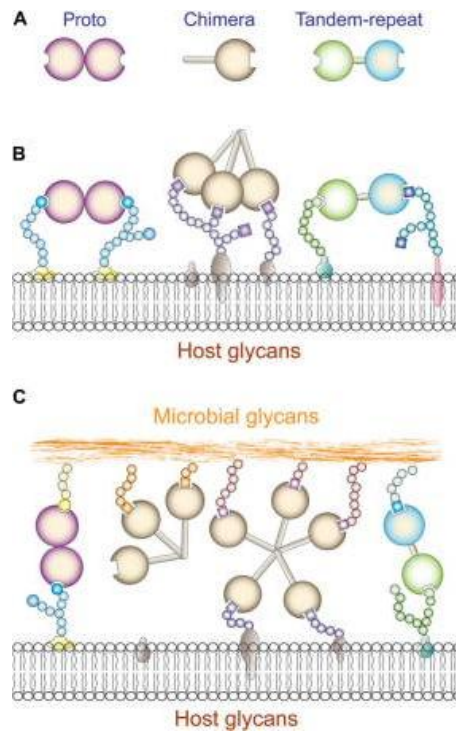


Figura 6. Oligomerització i reconeixement de les galectines. A) Representació esquemàtica de l'organització del domini de la galectina. B) Il·lustració esquemàtica de cis-interaccions de galectines, prototípiques, quimera i repeticions en tàndem, amb glucans d'acollida superfície cel·lular. C) Il·lustració esquemàtica de les interaccions en trans- de proto, quimera i repeticions en tàndem de galectines en la superfície de cel·lular de l'hoste amb glucans microbians (Vasta, Ahmed et al. 2012).

La

galectina-1 (Gal-1) s'expressa en molts teixits de manera intra i/o extracel·lular, tant en situacions normals com patològiques. A més, mostra una funcionalitat molt polivalent, gràcies a un ampli ventall d'activitats biològiques. Els estudis revelen que la interacció de Gal-1 amb els seus lligands és un regulador fonamental de la resposta immunitària, en tant que intervé en: l'homeòstasi i supervivència dels limfòcits T, inflamació, al·lèrgies i en el reconeixement de patògens. Gal-1 també ha estat involucrada en processos de diferenciació o desdiferenciació. En la seva forma oxidada Gal-1 participa en la regeneració del sistema nerviós central, després que aquest hagi estat lesionat.

Mentre que l'expressió o sobreexpressió de Gal-1 en el tumor i/o en els teixits que l'envolten és un índex de mal pronòstic, perquè freqüentment va associat a una major capacitat de disseminació cap als teixits adjacents i evasió de la resposta immunitària (Camby, Le Mercier et al. 2006).

La **galectina-3** (Gal-3), com s'ha dit anteriorment, és l'únic exemplar de quimera de la família de lectines d'unió a β -galactòsids, i està àmpliament expressada en nombroses cèl·lules. La seva localització subcel·lular és diversa, es pot trobar tant en nucli, citoplasma, mitocondries, superfície cel·lular i també es localitza en l'espai extracel·lular. Gal-3 ha estat involucrada en molts processos biològics com: quimioatracció, adhesió i activació cel·lular, proliferació, diferenciació, cicle cel·lular i apoptosi. Gràcies al reconeixement de glicosilacions, principalment de tipus N, Gal-3 estableix interaccions amb un ampli ventall de proteïnes. Són especialment destacables, pel motiu que ocupa aquesta introducció, la unió que Gal-3 pot establir amb Mac2 binding protein (membre del grup A de la SF-SRCR) i DMBT1 (membre del grup B de la SF-SRCR) i que es tractaran més endavant. Així doncs, donada la diversitat de funcionalitats biològiques que Gal-3 desenvolupa, a través d'interaccions específiques amb una varietat de proteïnes intra i extracel·lular, Gal-3 afecta nombrosos processos biològics i sembla estar implicat en diferents condicions fisiològiques i fisiopatològiques, com el desenvolupament, reaccions immunitàries, la transformació neoplàsica i la metastasi (Dumic, Dabelic et al. 2006).

3.2. RRC de membrana

3.2.1. Receptor de manosa

El **receptor de manosa (MR)/ CD206** es considera un PRR de membrana tipus I prototípic. Estructuralment es caracteritza per tenir una regió extracel·lular amb un domini ric en cisteïna i un domini fibronectina tipus II que enllaça amb vuit CDR, tots ells lecties tipus C. Intracel·lularment, presenta una cua citoplasmàtica curta en el seu extrem C-terminal (Vautier, MacCallum et al.

2012). **El MR interacciona directament amb carbohidrats (fucosa, manosa, GlcNAc) presents en un gran número de microorganismes (bacteris gram positius i negatius i fongs).** El seu reconeixement dóna lloc a l'endocitosis o la fagocitosis del complex receptor-ligand (Fraser, Koziel et al. 1998; Stahl and Ezekowitz 1998). Predominantment s'expressa intracel·lularment en els macròfags tissulars i en algunes poblacions de cèl·lules dendrítiques, que són presents en les diferents portes d'entrada dels patògens (pulmons, intestí, ronyons i pell). A més a més, una forma soluble de la proteïna pot ser tallada i alliberada de la membrana per l'acció de metal·loproteases. En infeccions fúngiques, però, és la senyalització via dectin-1 la responsable que el domini extracel·lular de MR s'escindeixi i actuï com un PRR soluble (Vautier, MacCallum et al. 2012). **El MR és una molècula clau en el processament antigènic que connecta la immunitat innata amb l'adaptativa.** MR també intervé en la presentació d'antígens no peptídics, per exemple el lipoarabinomanà dels micobacteris (Fraser, Koziel et al. 1998; Stahl and Ezekowitz 1998). Finalment, el reconeixement de PAMPs pel MR induïx diverses respostes efectores en els macròfags: augmentant la seva activitat bactericida, la secreció d'enzims lisosomals, la síntesis de citocines inflamatòries (IL-1, IL-6, TNF- α) i efectores (IL-12), principalment (Fraser, Koziel et al. 1998) (Stahl and Ezekowitz 1998).

3.2.2. Dectin-1

La proteïna **Dectin-1** és un receptor de membrana tipus II que s'uneix a β -glucans. Inicialment, les dues isoformes –A i B- de dectin-1 es van estudiar en ratolins. L'isoforma A, la més llarga, exposa el domini de lectina tipus C i una regió curta fibril·lar, a la part extracel·lular, a continuació uns 40 aa formen el domini transmembrana i finalment l'extrem N-terminal dóna lloc a la cua intracitoplasmàtica (Ariizumi, Shen et al. 2000). En canvi, la isoforma majoritària B no presenta la regió fibril·lar, en la part extracel·lular. El receptor Dectin-1 s'expressa principalment en cèl·lules del llinatge mieloide del ratolí, com ara: macròfags, cèl·lules dendrítiques i neutròfils. Per citometria de flux,

també s'ha detectat Dectin-1 en poblacions de limfòcits T i B, tot i que es desconeix el paper que jugaria en aquestes cèl·lules. Posteriorment es van realitzar estudis amb l'homòleg humà, que té un 60% d'identitat i un 71% d'homologia amb la proteïna murina. Tot i que en humans es van detectar moltes isoformes, la majoritària és novament la B, sense el petit domini fibril·lar extracel·lular. La major diferència entre les dues espècies de Dectin-1 és el patró de glicosilació. El CRD de les isoformes A i B en ratolins és decorat per dues N-glicosilacions, mentre només la isoforma humana A presenta una glicosilació en la regió fibril·lar extracel·lular.

La unió de Dectin-1 a β -glucans depèn de les diverses mides i ramificacions que aquestes presenten (Adams, Rice et al. 2008). El domini lectina tipus C de Dectin-1 és el responsable de la unió amb el seu lligand, i estructuralment és molt similar al d'altres dominis lectina. Però a diferència d'altres receptors, la seva interacció no és calci-dependent. A més, com succeeix amb altres lectines, sembla ser que la seva dimerització té un efecte cooperatiu en la unió amb els seus lligands (Brown, O'Callaghan et al. 2007)(Fig. 7).

En les cèl·lules de la immunitat innata, Dectin-1 contribueix a la fagocitosi, l'estrès oxidatiu, la degranulació neutrofílica, l'eliminació de fongs, la producció tant de lípids senyalitzadors d'inflamació com citocines i quimoquines que recluten i coordinen l'activació d'altres cèl·lules del sistema immunitari. Estudis *in vitro* indiquen que **Dectin-1 té un paper central en l'establiment de la resposta immunitària contra els fongs**. Aquesta afirmació es va confirmar en

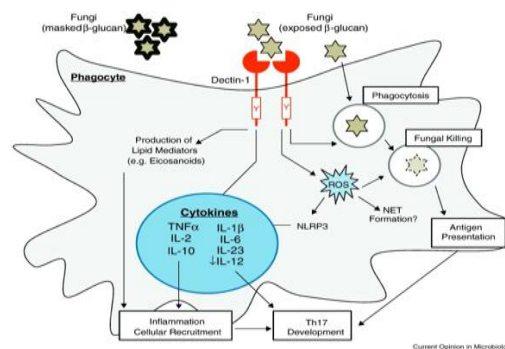


Figure 7. Interacció de dectin-1 amb el seu lligand i la senyalització que es deriva del reconeixement. Dectin-1 media diverses respostes cel·lulars, les més importants es mostren enquadrades (Drummond Rebecca A, Gordon D Brown 2011).).

infectar ratolins dectin-1 deficients (*knockout*, KO) per Dectin-1 amb fongs vius (*C. albicans*, *Pneumocystis carinii* i *Aspergillus fumigatus*). Un punt en aquest model, però, és el fet que els β -glucans són expressats per tots els fongs, ja siguin saprofítics o patogènics. De manera que no és clar com la resposta innata determina específicament quins fongs són patogènics i quins no. En aquest punt estudis recents han proposat que la col·laboració de Gal-3 i dectin-1 seria clau per assolir el grau d'especificitat requerit. S'ha descrit que Gal-3 s'uneix a manòsids, que s'expressen en les cobertes de patògens com *Pneumocystis carinii* i *C. albicans*, però no en fongs saprofítics (Esteban, Popp et al. 2011). El model proposat doncs, postula que Dectin-1 acuaría com a punt d'ancoratge dels mecanismes efectors del sistema immunitari, però que seria la Gal-3 la responsable de diferenciar específicament els organismes patogènics d'aquells que no ho són.

3.2.3. DC-SIGN

La **DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN)/ CD 209** és una proteïna transmembrana tipus II expressada en cèl·lules endotelials o en subpoblacions de macròfags. La seva estructura consisteix en un sol domini extracel·lular lectina tipus C, que reconeix manosa i estructures fucosilades. El CDR s'uneix a la regió transmembrana per un domini fibril·lar que al seu torn connecta amb la cua citoplasmàtica, que és la responsable de transmetre la senyalització de la proteïna. A través del domini fibril·lar, de DC-SIGN es poden formar tetràmers que és la conformació responsable del reconeixement dels microbis (*Candida sp.* i *A. fumigatus* entre d'altres). A diferència d'altres lectines, el reconeixement dels lligands de DC-SIGN no indueixen l'expressió de citocines, però si modulen l'activació, desencadenada per altres PRR, de la via NF- κ B, que recluta efectors del sistema immunitari. Els TLR són uns dels principals activadors la via NF- κ B, per tant DC-SIGN modula indirectament l'acció dels TLRs. En alguns casos, DC-SIGN també és capaç d'inhibir la senyalització efectuada per Dectin-1. Es postula que globalment DC-SIGN actua com un immunorregulador, evitant una inflamació exacerbada que

lesioni els teixits. Alguns estudis han proposat que aquesta capacitat immunoreguladora de la proteïna podria ser aprofitada per alguns patògens – per exemple VIH- per evadir la resposta immunitària (Vautier, MacCallum et al. 2012).

4. Receptors *Scavenger* (SR)

El terme *scavenger* (escombriaira) va néixer amb la descoberta que els macròfags eren capaços d'incorporar lipoproteïnes modificades, procés relacionat amb l'arteriosclerosi (Brown and Goldstein 1983). El primer receptor identificat que participava en aquesta nova funció dels macròfags, va ser el receptor *scavenger* classe A de macròfag tipus I i II (SR-AI/II). Així doncs, es va establir que els macròfags endociten les lipoproteïnes acetilades de baix pes molecular (*Low-density lipoprotein*, LDL) mitjançant el SR-AI i II. Malgrat el nom, el terme SR-A descriu un grup molt més ampli de proteïnes, estructuralment diverses, que és capaç de realitzar un ampli ventall de funcions (Sarrias, Gronlund et al. 2004; Pluddemann, Neyen et al. 2008). Els diferents SR estan involucrats en el reconeixement i endocitosi de molècules polianióniques, com per exemple: LDL acetilats o oxidats (acLDL o oxLDL), cèl·lules apoptòtiques, polirribonucleòtids, polisacàrids, lípids i algunes proteïnes. Per tant, els SR són capaços d'interaccionar amb un gran nombre d'estructures, tant pròpies de l'hoste (oxLDL i Gal-3 entre d'altres) com exògenes a aquest (per exemple LPS i LTA). El reconeixement dels lligands de SR (des de bacteris a cèl·lules del propi hoste) indueix la fagocitosis dels mateixos. A mesura que nous membres SR s'han anat caracteritzant, s'ha vist que des d'un punt de vista estructural divergien molt els uns dels altres. Més enllà del fet que uns eren solubles i els altres eren receptors de membrana, es va desvetllar que presentaven dominis molt diferents, des de lectina tipus C fins a domini col·lagen i/o domini SRCR. Però entre els SR no s'ha identificat cap domini comú i responsable de l'activitat *scavenger*. Per tot el que s'ha exposat **es podria dir que els membres SR formen una família de receptors**

estructuralment variada, però que comparteixen una funció similar (Martinez, Moestrup et al. 2011). Tenint en compte aquest fet, es va decidir classificar els membres SR en vuit classes, de l'A a la H, basant-se en l'estructura terciària proposada per cada membre (Fig. 8) (Pluddemann, Neyen et al. 2008). **La classe A dels SR es defineix perquè tots els seus membres presenten, com a mínim, un domini SRCR.**

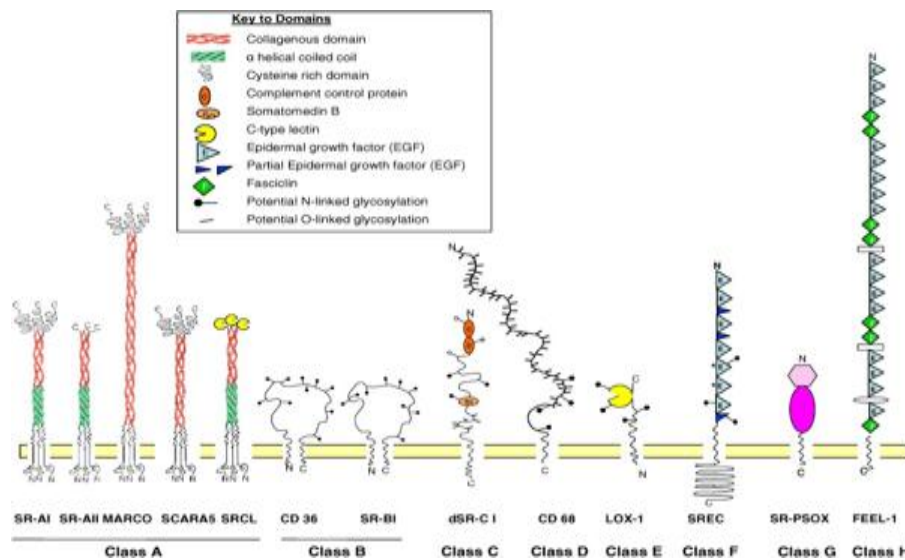


Figura 8. Arquitectura de les diferents classes de receptors *scavenger*. Els receptors s'agrupen en classes en funció de la seva homologia estructural (Pluddemann, Neyen et al. 2008).

La capacitat d'unió a grups polianiónics sembla ser una característica àmpliament conservada. Fins i tot en organismes primitius com les esponges, que no han desenvolupat cèl·lules immunitàries especialitzades, es troben proteïnes SR. En les esponges, els SR realitzen funcions com l'agregació i adhesió, permetent així interaccions cel·lulars (Blumbach, Pancer et al. 1998) (Pahler, Blumbach et al. 1998).

4.1. Classe A dels SR o superfamília SRCR

La superfamília de SRCR (*Scavenger Receptor Cysteine Rich Protein Superfamily, SRCR-SF*) forma un grup de molècules divers, comparable a la superfamília de les immunoglobulines, sense una funció comú. Els membres d'aquesta superfamília es troben en diversos tipus

cel·lulars, tant hematopoiètics (monòcits, limfòcits, etc...) i no hematopiètics (endotelis, epitelis com el gastrointestinal, broncopulmonar i genitourinari). També s'ha descrit que moltes de les proteïnes amb dominis SRCR tenen múltiples isoformes, variants produïdes per fenòmens de *splicing* alternatiu, com és el cas de DMBT1 (Pancer 2000). **La característica que els uneix, com s'ha dit anteriorment, és que tots ells presenten un, o més, dominis SRCR.** El motiu SRCR es pot presentar formant part de proteïnes mosaic, formades per múltiples dominis (combinant-se amb dominis EGF, serinproteases, col·lagen, etc...), o bé en repeticions en tàndem del domini SRCR, com a únic motiu de la proteïna (Sarrias, Gronlund et al. 2004). Per tant, **contràriament al que succeïa amb els SR, la classificació dels membres SRCR segueix criteris estructurals però no funcionals** (Martinez, Moestrup et al. 2011).

4.1.1. El domini SRCR

Estructuralment el domini SRCR el formen uns 90-110 residus aminoacídics rics en cisteïna. Existeixen dos tipus de domini que donen lloc a la classificació de la SF-SRCR en dos grans grups, A i B, basant-se en la quantitat de cisteïnes intradomini i el nombre d'exons que codifiquen el SRCR. Addicionalment, dins el grup B, es distingeixen dos subgrups segons si aquests estan formats per altres dominis extracel·lulars diferents a més del SRCR –és a dir, són proteïnes mosaic-, o bé únicament presenten dominis tipus SRCR. El domini SRCR del grup A està codificat per dos o més exons i conté 6 residus de cisteïna, els quals formen tres enllaços disulfur. En canvi, el domini grup B està codificat per un sol exó i presenta 8 cisteïnes, que donen lloc a quatre enllaços disulfur (Fig. 9A). Alguns membres, però, no segueixen aquest patró. Dins el grup A trobem proteïnes amb el domini SRCR truncat, el qual només presenta quatre cisteïnes. Paral·lelament, membres del grup B presenten sis cisteïnes en el seu domini SRCR, enlloc de vuit, com és el cas del segon domini de la proteïna CD5. Un altre tipus de

modificació sobre el domini SRCR del grup B es troba en la proteïna SP α /AIM i CRP-ductin, que contenen set cisteïnes en el segon i cinquè domini SRCR, respectivament (Martinez, Moestrup et al. 2011). Alineaments de les seqüències proteïques, així com estudis sobre el patró d'enllaços disulfur formats en diversos membres de la superfamília, revelen que la posició relativa de les cisteïnes i el patró d'enllaços disulfur que estableixen està molt conservat en tots els dominis SRCR (Martinez, Moestrup et al. 2011). El resultat dels estudis va determinar que pel grup B els enllaços es formen entre les cisteïnes: C1-C4, C2-C7, C3-C8 i C5-C6. Mentre que en el grup A manca l'enllaç C1-C4 (Fig. 9A). El motiu SRCR, a més, també té les posicions aminoacídiques molt conservades. Això es va corroborar en el seu moment gràcies a la cristallització del domini SRCR de la proteïna Mac2 binding protein (M2BP) i Marco del grup A (Fig. 9B) (Ojala, Pikkarainen et al. 2007) (Hohenester, Sasaki et al. 1999), i la posterior cristallització dels primer i tercer domini SRCR tipus B de la proteïna CD5 (Fig. 9C) (Garza-Garcia, Esposito et al. 2008) (Rodamilans, Munoz et al. 2007). Els estudis de cristallització van revelar que l'estructura del domini A SRCR comprèn entre sis o cinc làmines β plegades sobre una hèlix- α . Per la seva banda, el domini del grup B té una disposició similar a l'A. En el domini SRCR del grup B, quatre làmines- β antiparal·leles s'agrupen sobre una hèlix- α i addicionalment tres làmines- β antiparal·leles es disposen a la base del domini (Rodamilans, Munoz et al. 2007). Si es comparen les estructures descrites a dia d'avui, s'observa que les conformacions terciària d'ambdós dominis SRCR són superposables. A la llum d'aquests resultats, s'obre un nou debat sobre la conveniència de mantenir, o no, la distinció clàssica entre el grup A i B dins la SRCR-SF (Martinez, Moestrup et al. 2011).

Addicionalment, l'estudi de la disposició en l'espai del domini SRCR va permetre determinar que la seva conformació és previsible i estable en l'evolució (Sarrias, Gronlund et al. 2004). **La versatilitat del domini SRCR rau en el fet que els residus claus que estableixen l'estructura resten al centre de la mateixa, mentre que els aa que no intervien directament en l'estabilitat del tot –especialment aquells més exposats–, poden**

evolucionar amb relativa llibertat, permetent així la generació d'una gran diversitat funcional.

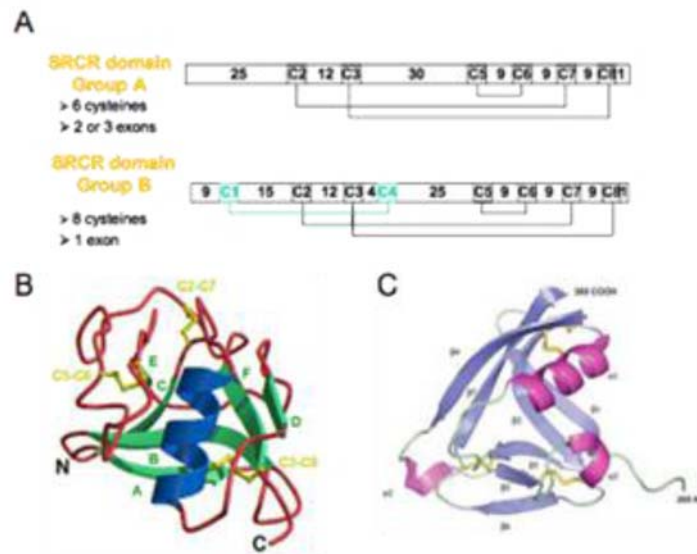


Figura 9. El domini SRCR tipus A i B. A, Esquema del patró de ponts disulfur dels dos tipus de domini SRCR. B, Visió de la conformació del domini SRCR tipus A. C, Visió de la conformació del domini SRCR tipus B (Modificació a partir dels articles Ojala, Pikkarainen et al. 2007, i Rodamilans, Munoz et al. 2007).

Tot i que el domini SRCR és present en diversos genomes tant de metazous inferiors -com és el cas de les esponges-, fins als superiors -com els mamífers-, alguns organismes en estadis evolutius intremittjos no presenten cap membre SRCR -com els nemàtodes-. D'aquesta manera, no és clar si el domini SRCR es va originar a partir d'un gen ancestral comú que va evolucionar i derivar des dels inicis de l'especiació -com indica el fet que es trobi en diversos genomes al llarg de l'escala evolutiva- o bé, si la seva aparició ha anat succeint, de manera independent al llarg d'aquesta (Dzik 2010). La darrera opció concordaria també amb l'existència de dos organitzacions genòmiques diferents per un mateix motiu (grups A i B de la superfamília SRCR). Però sigui quin sigui el seu origen, el que és clar és que **el domini SRCR és un dels pocs mòduls proteics que l'evolució ha seleccionat i conservat, donant origen a una plèiade important de proteïnes diferents.**

4.2. Membres SRCR del grup A

4.2.1. SR-A

El **receptor scavenger de classe A (SR-A)/ SCARA1** és el membre prototípic del grup A de la SF-SRCR (Fig. 10). SR-A va ser el primer membre de la SF-SRCR en ser clonat, a partir del seu mRNA aïllat en el pulmó boví, però és present en moltes més espècies, sent un receptor altament conseqvat. Posteriorment es van identificar tres isoformes, les quals es generen per *splicing* alternatiu a partir del mateix gen: SR-AI, SR-AII i SR-AIII. SR-AI és una glicoproteïna transmembrana de tipus II, que es diposa en les membranes formant trímers. Cada trímer està format per tres cadenes, cada una amb cua citoplasmàtica, un domini transmembrana, una regió espaciadora seguida d'un domini en α -hèlix enroscat i un domini col·lagen (format per triplets Gly-Xaa-Yaa), finalment un domini SRCR en el seu extrem C-terminal. El receptor SR-AII és estructuralment molt similar al primer, però amb un extrem C-terminal més curt, sense el domini SRCR (Pluddemann, Neyen et al. 2008). En canvi, SR-AIII és una forma truncada pel seu extrem C-terminal, retinguda al recticle endoplasmàtic (Sarrias, Gronlund et al. 2004).

SR-AI i II s'expressen en macròfags tissulars, des de les cèl·lules de Kupffer, els macròfags alveolars i passant pels macròfags modificats que es troben en les plaques ateroscleròtiques. També es troben en cèl·lules dendrítiques i endotelials, a més de'n múscul llis (Martinez, Moestrup et al. 2011). A més, sembla ser que l'expressió de SR-AI seria un marcador per a macròfags diferenciats, mentre que SR-AII es detecta en monòcits, i quan aquests es diferencien a macròfags els nivells de la proteïna no varien remarcablement. El que si s'ha descrit és l'expressió de SR-AI/AII en macròfags madurs. L'expressió d'aquests receptors confereix a les cèl·lules resistència envers diversos estímuls apoptòtics, com poden ser els oxLDL (Liao, Kodama et al. 2000).

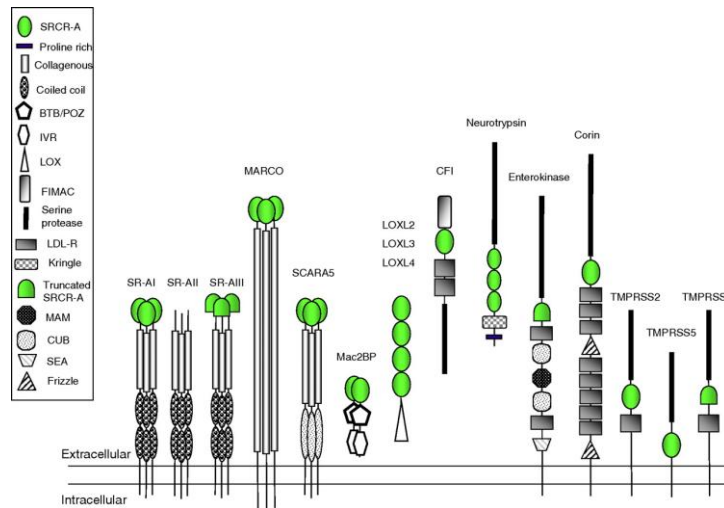


Figura 10. Representació esquemàtica dels membres del grup A de la SRCR-SF (Martinez. V. G., S. K. Moestrup. et al. 2011).

SR-AI i SR-AII són molècules multifuncionals i ambdues comparteixen la capacitat d'unir-se a lligands, tant endògens com exògens, mitjançant el seu domini col·lagen (Pluddemann, Neyen et al. 2007). La capacitat d'unió dels SR-A desencadena la internalització del lligand, així com l'activació de diferents vies de senyalització, si bé encara no es té un model tancat sobre la seva funcionalitat. S'ha descrit que **SR-AI i II estan implicats en processos inflamatoris, sent especialment rellevants en l'arterioesclerosi i en l'adhesió i fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques** (Platt and Gordon 2001). Pel que fa a la seva capacitat de reconèixer microbis (*E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* i *agalactiae* entre d'altres), SRA-I/II facilita la seva fagocitosi i posterior eliminació (Gough and Gordon 2000; Peiser, Mukhopadhyay et al. 2002). A més, l'endocitosi dels lligands de SR-A és redirigida cap a la presentació d'antigen, de manera que SR-A també es pot relacionar amb l'activació de cèl·lules T. El SR-A és, doncs, un exemple més de la relació íntima que s'estableix entre la immunitat innata i adaptativa, que actualment és un camp emergent de la immunologia.

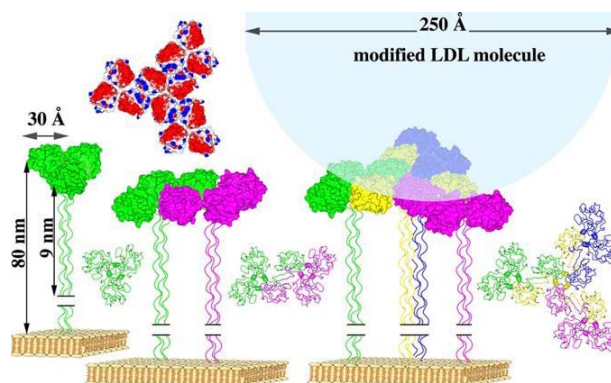
Alguns estudis han descrit que l'expressió dels receptors SR-A es troba altament regulada, tant per hormones com per citocines, de manera que la seva expressió varia segons la seva resposta en diferents situacions patològiques. Tot i que els lligands de SR-AI i SR-AII són molt similars, la regulació dels dos

receptors és diferent. S'ha suggerit que aquesta regulació diferenciada podria indicar que el domini SRCR –absent en SR-AII-, tot i no participar de l'unió als lligands, té una funció important en el receptor SR-AI. Paral·lelament, s'ha vist que la forma truncada SR-AIII inhibeix la funció dels altres dos SR-A (Gough, Greaves et al. 1998). Per tant, s'ha proposat que SR-AIII podria ser un dominant negatiu, actuant així com un sistema de control post-traduccional de l'expressió de SR-AI i AII.

4.2.2. MARCO

La proteïna **MARCO** (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*)/**SCARA2** també forma part del grup A de la SF-SRCR i, a més, comparteix amb SR-A similituds en l'estructura, patró d'expressió i lligands. SR-A i MARCO comparteixen la capacitat de trimeritzar (Fig. 11), però difereixen en el domini α -hèlix enroscat, que manca en el primer (Sarrias, Gronlund et al. 2004). D'altra banda, MARCO s'expressa constitutivament en certes poblacions de macròfags, concretament en els de la zona marginal, nòduls limfàtics i aquells residents en el peritoneu. La seva expressió és veu incrementada en molts macròfags tissulars en resposta a una infecció bacteriana, mitjançant l'activació de TLR (Bowdish and Gordon 2009). A més, s'ha descrit que cèl·lules dendrítiques expressen elevats nivells de MARCO quan aquestes són exposades a lisats tumorals (Pluddemann, Neyen et al. 2007). Aquest patró d'expressió es correspondria amb el d'una proteïna implicada en la defensa de l'hoste. Un altre factor que relaciona la funció de MARCO amb la immunitat innata és la capacitat que té per unir-se i fagocitar partícules inerts (per exemple, de CSiO_2 , causant de la silicosis), cèl·lules apoptòtiques i bacteris (*E. coli* i *S.aureus*). **S'ha descrit que la seva capacitat d'unió a bacteris, a diferència de SR-AI, depèn del domini SRCR. Concretament, depèn d'un motiu ric en arginines (RxR) present, amb modificacions (QxR), també en altres dominis SRCR de la família com $\text{Sp}\alpha$, DMBT1 i S4D-SRCRB** (Sarrias, Gronlund et al. 2004). En canvi, el domini col·lagen de MARCO no està implicat en el reconeixement directe dels lligands. S'ha vist, però, que indirectament el domini col·lagen n'afavoreix el reconeixement, ja

que per interactuar correctament amb les cobertes bacterianes cal que el domini SRCR es trobi trimeritzat.



©2007 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology

jbc

Figura 11. Modelització de la conformació de MARCO en dimeritzar (verd i rosa) i oligomeritzar (verd, groc, blau i rosa) els trimers preformats (verd) (Ojala, J. R., T. Pikkarainen, et al. 2007).

4.2.3. SCARA5

El receptor **SCARA5** (*Class A scavenger receptor member 5*) és un membre relativament nou de la família. Presenta els mateixos dominis que MARCO i el seu domini SRCR també és el responsable de la seva capacitat d'unió, però el seu domini col·lagen és més curt. El tret més característic de SCARA5 és el seu patró d'expressió. **A diferència dels altres receptors del grup A, l'expressió de SCARA5 es restringeix a epitelis mucosos** (Jiang, Oliver et al. 2006), sobretot en determinades poblacions cel·lulars en testicles, tràquea, pulmó, bufeta urinària i intestí prim. Com succeeix amb SR-AI/AII i MARCO, **SCARA5 s'uneix a bacteris Gram negatius i postius (per exemple, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, respectivament), però en canvi no és capaç d'endocitar oxLDL o acLDL**. D'altra banda, s'ha vist que en diverses línies cel·lulars canceroses i en mostres tumorals l'expressió de SCARA5 es troba disminuïda. Per tant, s'ha proposat que SCARA5 podria ser un gen supressor de tumors. Finalment, el paper del receptor també ha estat relacionat amb el desenvolupament del ronyó, on SCARA5 actuaria com un receptor de ferritina que mediarà en el lliurament de ferro a cèl·lules del ronyó embrionari (Li, Paragas et al. 2009).

4.2.4. Mac2 binding protein (M2BP)

A diferència dels altres membres del grup A, **Mac-2/gp-90 (glycoprotein 90)** és una proteïna secretada i altament glicosilada, que presenta quatre dominis proteics i un pèptid senyal. En el seu extrem N-terminal se situa el seu domini SRCR, mentre que els dominis segon i tercer són similars als dominis BTB/POZ (*Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac*, o bé *Poxvirus and Zinc-finger*) i IVR (*intervening region*), que serien responsables de l'oligomerització de la proteïna. Finalment, la seqüència en l'extrem C-terminal no té homologia amb cap altra proteïna. M2BP es troba en la matriu extracel·lular de molts teixits (com per exemple testicle, timus, pulmó, tracte gastrointestinal, melsa i múscul esquelètic) i fluids corporals (plasma, saliva i llet materna). M2BP s'ha identificat com un antigen associat a tumors, perquè en ells els nivells en sèrum de la proteïna són elevats. També es coneix que és un lligand de proteïnes extracel·lulars com fibronectina, nidogen i col·lagen IV, V i VI. Gràcies a l'elevat grau de glicosilació de M2BP, també s'uneix a galectines en l'espai extracel·lular, com la Gal-3 (també coneguda com Mac2). L'unió de M2BP amb Gal-3 sobre la superfície cel·lular promou l'agregació homotípica cel·lular.

4.3. Membres SRCR del grup B

4.3.1. Receptors únicament amb dominis SRCR

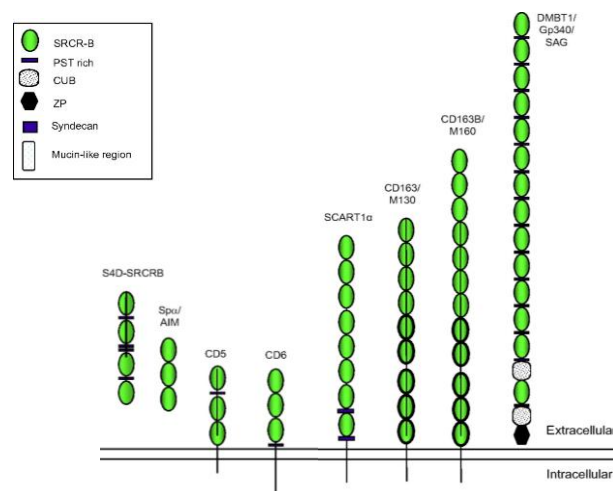


Figura 12. Representació esquemàtica dels membres del grup B de la SRCR-SF (Martinez, V. G., S. K. Moestrup, et al. 2011).

4.3.1.1. CD5 i CD6

Les proteïnes humanes i murines CD6 i CD5 estan codificades per dos gens adjacents i en una regió del cromosoma 19 del ratolí ortòloga a l'humà. L'organització intrònica i exònica dels gens humans també és molt similar, només es distingeix per la mida del primer intró i el nombre d'exons que codifiquen la regió citoplasmàtica (Sarrias, Gronlund et al. 2004). L'estructura conservada d'ambdós *loci*, tant en el genoma humà com en el murí, reforça la idea que possiblement la duplicació d'un gen primordial va originar CD5 i CD6, que a partir d'aquell moment han seguit evolucionant.

CD5

El gen humà i murí de **CD5/ T1/ Tp67** (en humans) **Lyt-1** (en ratolins) va ser dels primers del grup B en clonar-se, i posteriorment es van investigar en altres espècies. CD5 és una glicoproteïna de membrana tipus I de 67 kDa, amb tres dominis extracel·lulars SRCR i una regió rica en PST que separa el primer domini del segon (Fig. 12). Seguidament, 31 aa donen lloc a la regió transmembrana de CD5 que connecta amb els 91 aa de la cua citoplasmàtica, la qual està mancada d'activitat enzimàtica però en canvi està ben adaptada per a la transducció de senyals. La part extracel·lular de CD5 té dos trets característics que la distingeixen de CD6. D'una banda -com s'ha comentat anteriorment en aquesta introducció-, el domini SRCR2 de la proteïna no satisfà el consens establert pels membres del grup B, com sí ho fan els dominis SRCR restants de la proteïna i també els de CD6. Així, el segon domini té sis cisteïnes, la qual cosa és més pròpia del grup A, però sí que presenta l'enllaç disulfur entre les cisteïnes C1-C4, típic dels membres del grup B. D'altra banda, la regió espaciadora entre el primer i segons domini SRCR és rica en O-glicosilacions, que confereixen una disposició rígida d'aquesta zona extracel·lular de CD5, mentre que el CD6 -amb glicosilacions únicament de tipus N- seria molt més flexible. Si es comparen les seqüències aminoacídiques dels tres dominis SRCR de la proteïna, es pot establir que el domini més membrana-proximal SRCR3 és el més conservat (amb un 44% d'homologia amb els SRCR del grup), mentre

que el primer domini és el que presenta un major nombre de modificacions respecte la norma (25% d'homologia), i el SRCR2 estaria a un nivell intermig amb un 37% d'homologia.

L'expressió de CD5 és estrictament limfoide, es troba en cèl·lules T madures i en cèl·lules B1a, una subpoblació de limfòcits B. Cal destacar que l'expressió de CD5 és especialment elevada en limfòcits B reguladors (Breg) (Yanaba, Bouaziz et al. 2008) i T reguladors (Treg) (Fehervari and Sakaguchi 2004), així com cèl·lules B (Hippen, Tze et al. 2000) i T CD4⁺ (Kassiotis, Zamoyska et al. 2003) o CD8⁺ (Stamou, de Jersey et al. 2003) anergitzades mitjançant l'estimulació antigènica repetida amb un antigen. Tot i que, a nivells baixos en el sèrum en circulació, també s'ha detectat una forma soluble formada per l'escissió proteolítica que té lloc durant l'activació limfocitària (Calvo, Places et al. 1999). CD5 no només s'expressa en la superfície limfocitària, sinó que s'ha vist que en ella s'associen físicament al receptor clonotípic específic d'antigen de les cèl·lules B (*B cell receptor*, BCR) i cèl·lules T (*T cell receptor*, TCR), a més d'altres receptors de superfície com el CD9, CD2 i CD4 o CD8 (Lozano, Simarro et al. 2000). Estudis realitzats amb ratolins KO per CD5, han revelat que aquests presenten un major nombre de cèl·lules Treg, tant en timus com en sang perifèrica (Ordóñez-Rueda, Lozano et al. 2009). La posició que CD5 ocupa en la superfície cel·lular correspon a una molècula important per la modulació de la resposta de cèl·lules T i B, com així ho indica el fet que sigui reclutada en la sinapsi immunològica.

L'establiment de quin o quins són els seus lligands és un punt que ha generat i genera molta controvèrsia. Al voltant d'aquesta pregunta s'han realitzat diversos estudis, que han postulat diferents lligands per a CD5 tals com:

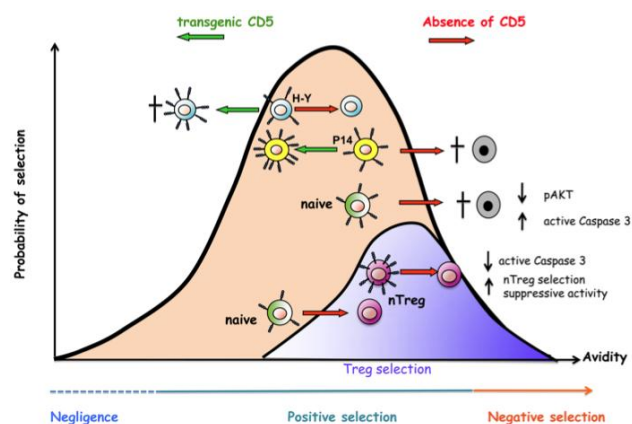


Figura 13. CD5 modula el llindar de selecció positiva i negativa en actuar com un regulador negatiu de la senyalització del receptor clonotípic de les cèl·lules T (TCR) dels timòcits (Soldevila G, Raman C, Lozano F 2011).

CD72 (Van de Velde, von Hoegen et al. 1991), gp-35-40 (Biancone, Bowen et al. 1996) gp-150 (Calvo, Places et al. 1999), la regió variable de la cadena IgV_H (Pospisil, Silverman et al. 2000) i el propi CD5 (Brown and Lacey 2010). El fet, però, és que aquests resultats no han estat reproduïts per altres grups. Per tant a dia d'avui els lligands de CD5 romanen per ésser caracteritzats. Paral·lelament a l'estudi dels lligands endògens de CD5, s'ha revelat el paper de CD5 com a PRR, en tant que s'uneix i aglutina fongs (Vera, Fenutria et al. 2009). Aquest reconeixement es pot competir amb β -glucans lineals, per tant s'ha proposat que aquest pot ser també un lligand de CD5 i el responsable del reconeixement d'agents patogènics (Vera, Fenutria et al. 2009). El fet que es desconegui un lligand clar per a CD5 ha dificultat molt l'establiment d'un model que expliqui les interaccions cel·lulars mediatees per CD5, ja sigui aquelles establertes entre les mateixes cèl·lules que expressen la proteïna (T-T i B-B), com amb altres tipus cel·lulars (cèl·lules dendrítiques, epitelials, estromàtiques i monòcits/macròfags) (Sarrias, Gronlund et al. 2004). El que està ampliamment acceptat, però, és el fet que CD5 actua com un co-receptor que pot modular negativament o positivament les respostes immunitàries segons el context experimental analitzat. Els nivells d'expressió de CD5 en timòcits madurs i en limfòcits T circulants es correlacionen amb l'avidesa del complex TCR-ligand. A més, s'ha vist que l'expressió superficial de CD5 està molt controlada en el timus durant el desenvolupament de les cèl·lules T. També en el timus s'ha observat que nivells baixos de CD5 promouen una major diferenciació de limfòcits Treg, alhora que es produeix una disminució de les Tverges (Fig. 13) (Lozano, Simarro et al. 2000). En relació amb la capacitat de regulació de l'activació limfocitària, CD5 s'ha revelat com una molècula relacionada amb la inflamació, tant en models experimentals d'encefalomielitis autoimmune (EAE) (Biancone, Bowen et al. 1996) com de xoc sèptic en ratolins (Vera, Fenutria et al. 2009). Ambdós estudis conclouen que la inhibició de la unió amb CD5 disminueix l'estat d'inflamació, que s'associa a una millora en el pronòstic de la malaltia. **A la llum dels resultats recollits per diferents autors es pot concloure que CD5 juga un paper rellevant en la immunomodulació de la defensa de l'hoste** (Martinez, Moestrup et al. 2011).

CD6

La proteïna humana **CD6** és una glicoproteïna de membrana de tipus I. Igual que CD5, la proteïna CD6 està formada per tres dominis extracel·lulars SRCR, una cua citoplasmàtica i una regió transmembrana de 26 aa hidrofòbics que connecta els dos extrems. La regió citoplasmàtica de CD6 no té activitat enzimàtica intrínseca, però sí diverses seqüències consens relacionades amb transducció de senyals (Robinson, Neuman de Vegvar et al. 1995). Existeixen al menys cinc isoformes de CD6 (CD6a, CD6b, CD6c, CD6d i CD6e) que són el resultat de diferents *splicing* alternatius dels exons que codifiquen la cua citoplasmàtica, sent CD6a la forma més llarga i predominant (Bowen, Whitney et al. 1997) que segons el seu estat de fosforilació fa entre 100 i 130 kDa. A diferència del CD5, la proteïna CD6 està formada per tres dominis extracel·lulars SRCR, una cua citoplasmàtica i una regió transmembrana de 26 a.a hidrofòbics que connecta els dos extrems. En la regió citoplasmàtica de CD6 no s'ha trobat activitat enzimàtica intrínseca, però sí diverses seqüències consens relacionades amb transducció de senyals (Robinson, Neuman de Vegvar et al. 1995). A part de les diferents formes de la cua citoplasmàtica esmentades, hi ha més característiques estructurals que diferencien CD6 de CD5, com el fet que CD6 no presenta cap regió rica en PST i està altament N-glicosilada, però no presenta O-glicosilacions. A més, tots els dominis extracel·lulars de la proteïna compleixen el consens pel domini SRCR del grup B.

CD6 s'expressa en timòcits, limfòcits T madurs i B1a. També s'ha trobat en regions del cervell, principalment en el còrtex del cerebel i en els ganglis basals (Kamoun, Kadin et al. 1981) i en cèl·lules NK (Braun M, Müller B et al. 2011). La primera interacció proteïna-proteïna mediada per un domini SRCR caracteritzada va ser la que s'estableix entre el CD6 i ALCAM/CD166 (Bowen, Patel et al. 1995), que és una molècula d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines expressada per limfòcits activats. La unió CD6-ALCAM estaria mediada pel tercer domini de CD6 (SRCR3) que reconeixeria el domini V-like més N-terminal d'ALCAM (D1) amb una estequiometria 1:1 (Whitney,

Starling et al. 1995; Bowen, Bajorath et al. 1996). Tot i que la funció última de CD6 encara es desconeix, la interacció entre CD6 i ALCAM podria explicar el paper que CD6 realitza en el desenvolupament i diferenciació dels limfòcits T (Bowen, Patel et al. 1995). Interessantment, s'ha reportat que l'activació limfocitària induïx l'aparició d'una forma de CD6 generada per splicing alternatiu que careix del domini SRCR3 responsable de l'interacció amb ALCAM (Oliveira, MI et al. 2001). Certs estudis han establert que CD6 pot actuar com un co-estimulador que sinergitza amb senyals activadores i proliferatives establertes a partir del complex TCR (Osorio, Garcia et al. 1994) encara que treballs més recents demostrarien que té una funció moduladora negativa de l'activació limfocitària similar al que ha estat reportat en CD5 (Oliveira MI et al. 2012). Addicionalment, s'ha descrit que AcMos anti-CD6 inhibeixen tant la proliferació antígen-específica com la autorreactivitat induïda en clons T (Singer, Richardson et al. 1996). Finalment també s'ha observat que, tal i com succeïa amb CD5, CD6 també participa de la sinapsis immunològica (Gimferrer, Farnos et al. 2003).

Per tot l'exposat, **prèn força la tesi que postula que CD6 és una proteïna de gran importància per a l'establiment de la resposta immunològica en general i, concretament, en la regulació de l'activació i diferenciació de les cèl·lules T.** D'altra banda, també s'ha descrit que CD6 s'uneix a LPS, la qual cosa deriva en una activació de la via de senyalització de les MAPK. També s'ha vist que la forma soluble de CD6 és capaç de reconèixer i aglutinar bacteris gram negatius (*E. coli*) i gram positius (*S. aureus*), a l'hora que produeix una disminució de l'alliberament de citocines proinflamatòries com $TNF\alpha$, IL6 i IL-1 β i disminueix la mortalitat en situacions de sepsis (Sarrias, Farnos et al. 2007). **A la llum dels diferents processos on CD6 participa, la consideració d'aquesta proteïna com a diana terapèutica està emergent en diferents patologies relacionades amb la inflamació i el càncer.**

El fet que tant CD6 com CD5 siguin capaços de realitzar funcions de PRR en la superfície de limfòcits, reconeixent bacteris i fongs respectivament, és un descobriment que reforça la idea que la immunitat innata i adaptativa estan lligades d'una manera molt més íntima del que es podia pensar fa només uns pocs anys. El fet que els limfòcits presentin PRRs com els TLRs, CD5 i CD6 confereix a aquests leucòcits la capacitat de sensar la presència d'un ampli ventall de lligands microbians al seu microambient immediat. Encara es desconeix, però, si la unió de CD5 i CD6 a PAMPs contibueix a la modulació de la resposat adaptativa, com se sap que succeeix amb els TLRs.

4.3.1.2. CD163

CD163, també anomenat **RM3/1 antigen**, **M130** i **HbSR**, és una proteïna de membrana amb una part extracel·lular d'uns 1003 aa, una regió transmembrana de 24 residus i una cua citoplasmàtica curta de 49 aa (Sarrias, Gronlund et al. 2004). Tot i que, degut a l'acció de metaloproteases que són capaces d'alliberar la part extracel·lular de la proteïna, aquesta també es pot trobar en fase soluble en la circulació. La part extracel·lular està formada per 9 dominis SRCR del grup B i dos polipèptids rics en PST. A més, tota ella es troba altament glicosilada, majoritàriament per glicosilacions de tipus N. Un dels polipèptids separa els dominis SRCR 6 i 7, mentre l'altre connecta el darrer domini SRCR amb la regió transmembrana. La cua intracitoplasmàtica està subjecta a modificacions mitjançant *splicing* alternatiu que dóna lloc a diverses isoformes de CD163, que difereixen en la longitud de la seva cua citoplasmàtica. També mitjançant un *splicing* alternatiu, però en aquest cas en la regió extracel·lular, es genera una forma truncada de CD163, que està composta de només tres dominis SRCR i no conté cap regió transmembrana (Law, Micklem et al. 1993; Ritter, Buechler et al. 1999). Totes les variants de cua citoplasmàtica que presenta CD163 comparteixen una regió proximal a la membrana, que inclou un motiu d'internalització hidrofòbic (Nielsen, Madsen et al. 2006). Cada isoforma presenta una localització en les membranes cel·lulars característica. Així la variant de cua curta CD163 es troba en la membrana citoplasmàtica, mentre que les variants de cua llarga són abundants en l'àrea

de la xarxa trans-Golgi i en endosomes. **Com a resultat d'aquestes diferències en els patrons de localització subcel·lular de les diferents varietats de CD163, segons la seva cua citoplasmàtica, mostren activitats endocítiques divergents.** S'ha proposat que la fosforilació de la cua és clau en la seva via de senyalització (Ritter, Buechler et al. 2001). Aquest model podria explicar com varia la funcionalitat de les diferents formes de CD163.

L'expressió de CD163 es limita a les cèl·lules del llinatge de monocític/macrofàgic i s'ha estudiat més extensament en l'home i en la rata (Akila, Prashant et al. 2012). La proteïna és present en monòcits perifèrics i també en macròfags madurs de teixits, que expressen una alta concentració de CD163 com per exemple: cèl·lules de Kupffer en el fetge, macròfags en la polpa vermella de la melsa, macròfags corticals en el timus, macròfags madurs residents en medul·la òssia, perivascular i macròfags en les meninges dels del teixit nerviós central, a més dels macròfags dispersos en altres teixits. A més, nivells alts de macròfags CD163 positius també s'han detectat en situacions de inflamació crònica, també durant el període de resolució en una reacció aguda inflamatòria i teixits cicatritzants. Atès que, macròfags acabats d'infiltrar són CD163-negatius (Van den Heuvel, Tensen et al. 1999), s'ha suggerit que els macròfags CD163 positius (també anomenats macròfags tipus M2 o anti-inflamatoris) juguen un paper en la resolució de la inflamació, i per això es troben en gran nombre en el teixit inflamat. **El primer rol funcional, però, que se li va adscriure a CD163 va ser el d'aclarir la sang, actuant com a receptor de l'hemoglobina (HbSR)** (Schaer, Schaer et al. 2006). **En últim terme la interacció de CD163 amb l'hemoglobina té una potencial funció immunoreguladora (antiinflamatòria), que pot estar relacionada amb la que es desenvolupa en les situacions d'inflamació anteriorment esmentades. També s'ha vist que CD163 no interacciona únicament amb l'hemoglobina, sinó que és capaç de reconèixer el complex hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp). Quan això succeeix el complex és menys sensible a l'oxidació, de manera que fins hi tot en**

situacions d'estrès oxidatiu CD163 seguiria actuant en l'aclariment de la sang. CD163 també interactua directament amb els eritroblasts, gràcies a un motiu situat en el segon domini SRCR de la proteïna. La interacció de CD163 amb aquest motiu eritroblastós promou el creixement i/o supervivència d'aquestes cèl·lules. Això suggereix un possible paper regulador de CD163 en l'eritropoesi. Per tant, CD163 en els macròfags del fetge i la melsa podria tenir una doble funció (és a dir, intervenir simultàniament en l'aclariment de l'Hb i en la formació de nous eritròcits) (Akila, Prashant et al. 2012). A més de les funcions homeostàtiques anteriorment descrites de CD163, també s'ha observat que tant el CD163 de membrana com el soluble s'uneixen a bacteris, tant d'espècies Gram-negatives com Gram-positives i a virus (van Gorp, H et al. 2010). El mateix motiu que dirigeix l'adhesió a eritroblasts, és també el responsable del reconeixement bacterià. S'ha establert que quan CD163 interacciona amb bacteris es produeixen citocines pro-inflamatòries, com el TNF- α , la qual cosa contribuiria a l'activació, o si més no, a la iniciació d'una resposta inflamatòria local per eliminar la infecció en les seves primeres fases. Actualment es treballa en un model en el que l'expressió del CD163 estaria íntimament regulada per mediadors pro-inflamatoris (interferó- γ o TNF α) i anti-inflamatoris (IL-10 i IL-6), que relacionarien la proteïna amb la defensa immunitària. El rol biològic de CD163 es dona en diferents situacions però possiblement totes elles relacionades amb **un paper preminentment anti-inflamatori del receptor CD163.**

4.3.1.3. Sp α /AIM/Ap16/CD5L

La proteïna humana Sp α (**secreted protein α**) (Gebe, Kiener et al. 1997) i la murina AIM (**Apoptosis inhibitor of macrophage**) (Miyazaki, Hirokami et al. 1999) són proteïnes solubles i secretades. Les dues estan formades per tres dominis SRCR i comparteixen un 70% de la seqüència aminoacídica, si bé la murina està altament glicosilada i la humana no. Pel que fa al patró d'expressió ambdues proteïnes també tenen alguns punts comuns i altres propis de cadascuna.

D'una banda, Sp α es troba en macròfags de òrgans limfoides (timus, nòduls limfàtics, melsa i moll d'ós) i no limfoides (pulmó i fetge). De l'altra, AIM s'expressa a baixos nivells en melsa, fetge, timus i pulmó, i a alts nivells en cèl·lules adherents d'exudats peritoneals. L'expressió observada en aquests teixits correspon parcialment a poblacions de macròfags. Tant la proteïna humana com la murina s'han detectat en sèrum, i en el cas de Sp α s'ha vist que s'associa amb fraccions d'IgM però no d'IgG ni IgA. A dia d'avui, però, no es coneix la funció final de Sp α , si bé s'ha descrit que s'uneix a monòcits, cèl·lules B i T de sang perifèrica i cèl·lules mieloides no activades. **A més, s'ha descrit la possible existència d'un receptor per Sp α en monòcits perifèrics i algunes línies cel·lulars, això implicaria que Sp α té un possible paper en l'activació, funcionalitat i/o supervivència dels monòcits (Gebe, Kiener et al. 1997). D'altra banda, s'ha reportat que la proteïna humana reconeix tant bacteris Gram positiu com negatiu, pel que se'l considera un PRR més (Sarrias, Rosello et al. 2005).** A més, en el mateix article, es mostra que Sp α agrega bacteris Gram negatiu. Aquesta propietat és molt rellevant, perquè per si sola dóna un avantatge defensiu contra la infecció (perquè facilita l'aclariment dels agents patogènics en circulació).

Pel que fa a AIM, s'ha proposat que regula negativament l'apoptosi de timòcits doble positius i d'altres tipus cel·lulars als qui s'uneix, per exemple els monòcitos (Kuwata, Watanabe et al. 2003). Per tant, a més d'influir en la formació del repertori de cèl·lules T, AIM podria jugar un important paper en els llocs d'inflamació i infecció. Aquesta hipòtesi s'ha vist reforçada per publicacions recents que relacionen l'endocitosi d'AIM en adipòcits amb canvis en el seu metabolisme lipídic (Miyazaki, T et al. 2012). Aquests resultats suggereixen que la relació entre l'obesitat i la inflamació - associada a aquesta patologia- podria passar per AIM (Kurokawa, Arai et al. 2010).

4.3.1.4. S4D-SRCRB

La proteïna soluble humana **S4D-SRCRB** (**Soluble 4 Doimains-SRCR group B**), una de les darreres descrites dins el grup B, està formada per quatre dominis SRCR molt similars entre ells i espaiats per pèptids rics en PST. Alineant la seqüència dels dominis SRCR de diferents membres de la SRCR-SF es va determinar que S4D-SRCRB compartia més similituds amb DMBT1 que amb cap altre membre conegut (Padilla, Pujana et al. 2002). Mitjançant estudis de Northern blot es va observar que S4D-SRCRB s'expressava en dos isoformes diferents, una de 2,8kb i l'altra de 1,5kb. La primera tenia un patró d'expressió tissular molt restringit, i es detectava només en placenta i ronyó. Mentre que la forma menor presentava una distribució més àmplia i es trobava en el fetge, cor, cervell, melsa, intestí, ronyó, placenta i en PBL (leucòcits de sang perifèrica) (Padilla, Pujana et al. 2002). L'estudi de l'expressió de la proteïna en diferents línies cel·lulars fet pels mateixos autors va reforçar els resultats esmentats anteriorment. Fins ara no s'havia associat cap funció a S4D-SRCRB, si bé s'havia suggerit que podia participar en el manteniment de l'homeòstasi general de l'organisme (Padilla, Pujana et al. 2002).

4.3.2. Receptors amb regions extracel·lulars mosaics

4.3.2.1. DMBT1/muclin/Hensin/CRP-ductin/SAG/Ebnerin/H3/gp340

El gen **dmbt1** (**Deleted in Malignant Brain Tumor 1**) codifica un membre prototípic del grup B de la SF-SRCR, que es caracteritza per donar lloc a una proteïna mosaic, formada per tres tipus de dominis diferents: SRCR, CUB i ZP. El domini CUB es troba en proteïnes del complement, per exemple en la C1s/C1r, mentre el domini ZP es va descriure per primer cop com un possible receptor d'esperma en la *zona pellucida* de l'ovòcit.

4.3.2.1.a. Les formes i l'expressió de DMBT1

Estudis independents realitzats sobre diferents proteïnes, en diferents espècies, van convergir en el gen *dmbt1*. A dia d'avui, es coneix que aquest

gen està altament conservat en diverses espècies que presenten proteïnes homòlogues a la humana (DMBT1), les quals s'anomenen: CRP-ductin (ratolí), Ebnerin (rata), Hensin (conill), Bovine Gallbladder Mucin (vaca) i H3 (mico) (Sarrias, Gronlund et al. 2004). A més, s'ha descrit que **mitjançant *splicing* alternatiu es generen diverses isoformes a partir del gen *dmbt1***. Les proteïnes humanes gp-340 i Salivary Agglutinin (SAG) han resultat ser dues isoformes de DMBT1 expressades a pulmó i saliva, respectivament.

Com s'ha exposat anteriorment, estructuralment DMBT1 es diferencia dels altres membres del grup B descrits en aquesta introducció pel fet que és una proteïna mosaic. Per tant, està formada per un nombre variable de repeticions de dominis SRCR, CUB i ZP, a més de regions riques en PST situades entre dominis SRCR, motiu pel qual se'ls anomena SID (*SRCR interspersed domain*). Així en humans, la proteïna gp340 està formada per 14 dominis SRCR, separats per SID, excepte els dominis SRCR 4 i 5 que formen un tàndem. Una regió rica en treonines i un domini CUB segueixen al domini SRCR 13, mentre que el darrer domini SRCR connecta amb una regió PST, seguida d'un segon domini CUB i un domini ZP. Aquesta organització proteica presenta modificacions tant en isoformes -dins la mateixa espècie-, com en proteïnes homòlogues. Per exemple, la proteïna humana DMBT1 està escurçada per la part C terminal, de manera que li manquen 5 dominis SRCR i 4 SID. Altres exemples són la proteïna homòloga en rata, que conté 4 dominis SRCR, 3 CUB i un domini ZP; la murina que expressa 8 dominis SRCR, 5 CUB i un domini ZP; i també hensin - en conill- que està formada per 4 dominis SRCR, 3 CUB i un domini ZP (Fig. 14). Tot i que la majoria de proteïnes codificades per DMBT1 són secretades a l'espai extracel·lular, es coneix que aquest gen pot codificar per un domini hidrofòbic transmembrana i un altre citoplasmàtic (Mollenhauer, Holmskov et al. 1999). A dia d'avui, ni en humans ni en conills, no s'han trobat formes transmembrana de la proteïna; en canvi, la isoforma α de la proteïna CRP-ductin de ratolí és una proteïna de membrana, mentre que la isoforma β se secreta. La proteïna homòloga en rata, ebnerin, també es troba en dues formes: unida a la membrana i soluble (Sarrias, Gronlund et al. 2004). A partir

de la seqüència proteica de DMBT1/gp340/SAG s'ha pogut determinar fins a 12 lloc potencials de N-glicosilacions, a més les regions SID –o PST- que també representen possibles llocs d'O-glicosilació (Bikker, Ligtenberg et al. 2002). **La importància de les glicosilacions en les proteïnes generades a partir de DMBT1 es manifesta clarament analitzant el seu pes molecular, que pot augmentar fins un 25% del total gràcies a aquest tipus de modificació post-traduccional.**

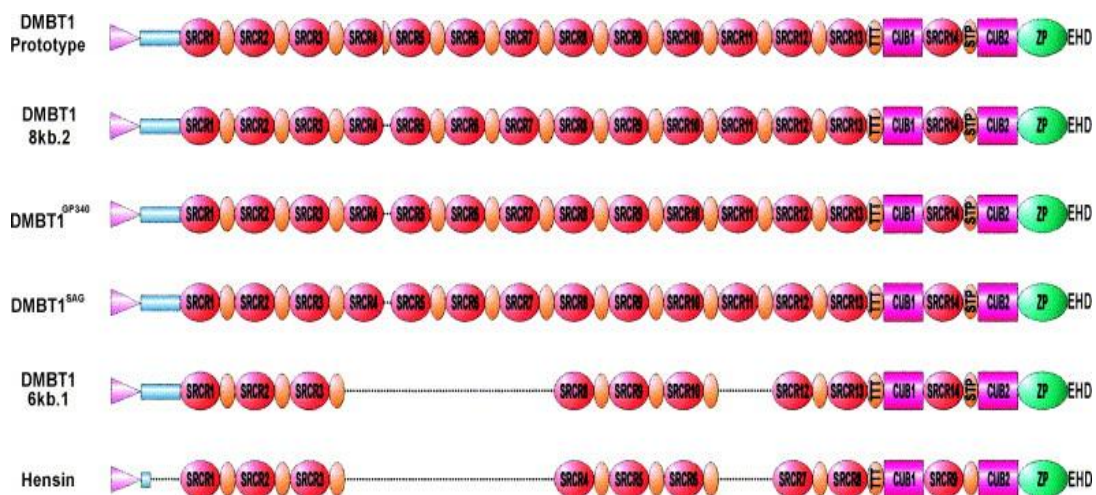


Figura 14. Esquema de les relacions entre l'estructura genòmica i proteica de DMBT1. La línia superior mostra l'escala en kilobases (kb). La segona línia mostra l'estructura exó-intró de DMBT1 a escala. Els exons s'han col·loreat segons el tipus de domini. L'exó 55 (requadre negre) correspon al domini transmembrana putatiu que encara no ha estat identificat en trànscrip humans. El locus DMBT1 conté dues regions repetitives amb una elevada homologia tant en l'exó com en les seqüències d'introns. Quatre unitats curtes repetitives (fletxes blaves) són presents a la regió 5', mentre que 12 grans unitats repetitives (fletxes vermelles) de 3-4 kb de longitud estan presents en el domini SRCR i les regions SRCR interspersed domain (SID) (J. Mollenhauer et al. (2007).

Estudis d'immunohistoquímica i de PCR a temps real mostren que *DMBT1* es troba expressat en un ampli repertori d'epitelis, sent els tractes respiratori (tràquea i pulmó) i gastrointestinal (glàndula salival, estómac i intestí prim) els teixits amb els nivells més elevats de la proteïna. Mentre que en cervell, glàndules mamàries i tracte urogenital l'expressió de la proteïna és més moderada. També s'ha observat que l'expressió de diferents trànscrip varia en cada teixit, i també al llarg del desenvolupament de l'animal. Per exemple, en el pulmó fetal s'han trobat tres trànscrip (de 8, 7'5 i 6 kb), mentre que en el pulmó adult només es detecta el trànscrip més gran, que correspon a la proteïna de DMBT1^{gp340}. Per contra, en l'intestí prim d'un adult són presents els

tràncits de 7'5 i 6 kb. El patró d'expressió de la proteïna en altres espècies és més o menys similar a l'humà. De manera que trobem que CRP-ductin s'expressa clarament en les criptes de l'intestí prim al llarg de totes les seves etapes de diferenciació. Això és des de les cèl·lules mare a la base de les criptes, fins a les cèl·lules diferenciades terminalment situades a la part superior de les vellositats intestinals. CRP-ductin també es troba en les cèl·lules del coll de l'estómac i en el còlon. La proteïna murina també s'ha detectat en el pàncrees i els seus conductes, així com en els grans conductes hepàtics de l'epiteli de revestiment. Paral·lelament, en rata, Ebrein s'ha detectat també en intestí, fetge, pulmó, cor i testicles, així com en les cèl·lules secretores de la glàndula de Von Ebner. A més, gràcies a un model de dany hepàtic es va descobrir que Ebnerin s'expressa en una població de cèl·lules que apareixen durant la regeneració del teixit. També en conill els nivells més alts de Hensin es detecten en l'intestí, i nivells més moderats en estómac, fetge i còrtex renal (Sarrias, Gronlund et al. 2004).

4.3.2.1.b. Regulació i funció de DMBT1

Diferents estudis han avançat en la comprensió dels mecanismes que regulen DMBT1. D'una banda, mitjançant assajos de *microarray* i l'estimulació hormonal d'endometris, i de l'altra estudiant els nivells d'expressió de DMBT1 en diferents escenaris d'inflamació en la mucosa intestinal. Els primers experiments van establir que DMBT1 és un gen sensible a estrògens amb un possible paper en la proliferació endometrial o la diferenciació, i podrien estar implicats en la supressió de tumors i la protecció de la mucosa de l'úter (Tynan, Pacia et al. 2005). Mentre que els resultats obtinguts en la mucosa intestinal van revelar que el gen *dmbt1* es regula positivament mitjançant la via de senyalització de NF- κ B, la qual s'inicia via NOD2 i/o TLR4. Això s'ha vist en malalts de Crohn, els quals presentaven una expressió de DMBT1 molt elevada, però no així en aquells malats amb el receptor NOD2 mutat. El model de regulació de DMBT1 per la via NF- κ B també explicaria com la proteïna inhibeix la citoinvasió de la soca *Salmonella. sp* entèrica per l'activació de la senyalització de NF- κ B, induïda tant pel muramil dipèptid (MDP) com pel LPS

(Rosenstiel, Sina et al. 2007) (Fig. 15).



Figura 15. DMBT1 actua, des de l'espai extracel·lular, en un circuit homeostàtic anti-inflamatori. Els bacteris (cercles blaus) poden activar el factor NF-KB a través del receptor NOD2 i/o TLR4, que detecten la invasió bacteriana. Al seu torn, l'activació del factor NF-KB eleva l'expressió i secreció de DMBT1. Alhora, DMBT1 dificulta la invasió bacteriana i inhibeix l'estimulació del TLR4, mediada per NF-KB. En conseqüència, es preveu que també s'aboleixi la regulació a l'alça de DMBT1. Per tant, DMBT1 actua com a receptor extracel·lular d'una via de senyalització que s'autoregula, la qual cosa serveix per establir una resposta equilibrada en les mucoses, contra els bacteris patògens i/o la pròpia flora (J. Mollenhauer et al. 2007).

La localització de DMBT1, en epitelis i mucoses en contacte amb el medi extern, així com la seva regulació, són propis d'una proteïna amb funcions immunitàries de la primera línia de defensa, les mucoses. La possibilitat que les proteïnes codificades per *DMBT1* estiguessin actuant com a PRR es va confirmar gràcies a estudis que mostraven que **les proteïnes (DMBT1/SAG/gp-340) s'uneixen i agreguen un gran espectre de bacteris gram negatius** (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *Prevotella intermedia* i *Helicobacter pylori*) **i positius** (*Streptococcus mutans* i *Lactobacillus caesi*) **i virus** (IAV i VIH-I) (Madsen, Mollenhauer et al. 2010). Bikker i col·laboradors van determinar que el motius consens VEVLxxxxW aïllat era capaç d'unir-se i agregar *S. mutans* de manera calci-depenent (Bikker, Ligtenberg et al. 2004). L'existència d'un motiu, en els dominis de DMBT1^{SAG} i d'altres membres del grup B, que permet el reconeixement de bacteris recorda la situació exposada pel motiu R/QxR de MARCO i membres del grup A. Una unió ben diferent és la responsable de la interacció de DMBT1^{gp340} amb el virus IAV, la qual és calci-independent i es produïx per la unió del virus als residus terminals d'àcid siàlic de les glicosilacions de la proteïna. Es coneix que el grau de glicosilació de DMBT1^{gp340} varia entre individus, i la mateixa observació s'ha fet respecte l'activitat anti-IAV de DMBT1^{gp340} entre diferents donants. D'altra banda, s'ha vist que la DMBT1^{gp340} recombinant i la DMBT1^{SAG} nativa interaccionen amb la gp-120 de la coberta del virus HIV-1 de manera calci-independent, a diferència del que succeeix amb IAV. Així doncs, DMBT1^{SAG} seria

un dels components que explicarien perquè la saliva humana inhibeix *in vitro* la infecció per HIV-1. Estudiant la interacció de dominis recombinants de DMBT1 i de la forma completa de la mateixa, DMBT1^{SAG}, es va veure que la unió amb HIV-1 era major quan es treballava amb la darrera. Partint d'aquesta observació, es va proposar que l'estructura multivalent de la proteïna permet augmentar l'avidesa de DMBT1 envers el seu lligand. Si bé encara no és clar si un sol domini SRCR pot reconèixer diverses regions de gp-120 del virus HIV-1, o bé si diversos dominis SRCR poden unir-se a la mateixa molècula de gp-120. La primera opció obriria la possibilitat a que DMBT1 aglutinés gp-120, facilitant així la seva eliminació. Però, alhora, estaria generant un augment local de la concentració del virus, la qual cosa pot tenir conseqüències negatives. Estudis recents realitzats amb línies cel·lulars derivades del tracte genital, han revelat que DMBT1^{gp340} pot facilitar la transmissió des de la part apical a la basolateral en cèl·lules no infectades (Stoddard, Ni et al. 2009). **Aquestes observacions posen de relleu el fet que proteïnes de la immunitat innata que normalment protegeixen a l'organisme de possibles infeccions, en ocasions poden ser emprades pels patògens com a punts d'entrada.**

A més de la unió a bacteris i virus, les diferents formes de DMBT1 també reconeixen a moltes proteïnes endògenes, relacionades tant amb la defensa innata, com amb d'altres processos biològics. La interacció que ha estat descrita amb més detall és la que es produeix amb les proteïnes surfactants SP-D i SP-A. El seu reconeixement és de tipus proteïna-proteïna i calci-dependent, i no intervé el domini lectina dels surfactants. Com s'ha dit en l'apartat 3.1.1, els surfactants són proteïnes importants en la fisiologia i protecció del tracte respiratori. Els efectes d'aquests i DMBT1^{gp340} semblen ser sinèrgics. A més, estudiant preparacions de neutròfils pre-incubats amb el virus IAV, l'estrés oxidatiu augmenta amb la presència de SP-D per fer front al patògen. Però si a aquestes preparacions s'hi afegeix DMBT1^{gp340}, aleshores l'estrés oxidatiu disminueix (White, Crouch et al. 2005). Així doncs, la capacitat antiinflamatòria de DMBT1 en aquest cas limitaria un possible dany tissular, derivat de la presència exagerada de radicals d'oxigen on es localitza la infecció. Altres

l·ligands endògens de DMBT1 són l'IgA secretòria, factors trefoil (TFFs), MUC5B, GAL-3, proteïnes complement com C1q i lactoferina. Es coneix que moltes d'aquestes interaccions estan dirigides pel motiu VELVxxxxW i també per interaccions electroestàtiques, com és el cas de l'IgA secretòria que s'inhibeixen amb concentracions altes de salts. L'ample ventall de proteïnes amb les que DMBT1 interacciona explicaria les molt diverses funcions que realitza.

4.3.2.1.c. El rol de DMBT1 en la diferenciació i regeneració d'epitelis

Més enllà de la seva participació en la defensa d'epitelis, **DMBT1 també intervé en processos de desenvolupament, regeneració i diferenciació cel·lulars.** De fet el gen *DMBT1* es va identificar i anomenar a partir de l'estudi de delecions en tumor malignes en cervell (Mollenhauer, Wiemann et al. 1997). Malgrat això, posteriorment es veuria que les mutacions inactivadores del gen són puntals i infreqüents en aquest tipus de tumors (Martinez, Moestrup et al. 2011). El primer cop que es va relacionar la proteïna DMBT1 amb la diferenciació d'epitelis va ser gràcies a l'estudi de la fisiologia del ronyó en condicions d'acidosis. Concretament, primer es va veure el paper de la proteïna ortòloga de DMBT1 en conill, Hensin, i posteriorment mitjançant models en ratolins, es va confirmar el rol de CRP-ductin, la proteïna murina (Schwartz and Al-Awqati 2005). **Estudis realitzats per Al-Awqati i col·laboradors van revelar que la secreció de monòmers de Hensin, seguida de la seva polimerització per Gal-3, dirigia les cèl·lules intercalades (IC) tipus β cap a l'últim estadi del seu programa de diferenciació.** El darrer estadi del programa condueix al subtipus cel·lular IC- β a esdevenir cèl·lules del subtipus α (IC- α). La diferenciació terminal que patien les IC- β s'associava amb una repolaritat dels canals de les cèl·lules IC- β , que presentaven una localització invertida en les IC- α . **El fenomen de la diferenciació terminal que Hensin dirigeix en les cèl·lules intercalades, s'associa a un canvi en la seva fisiologia, de manera que cèl·lules que reabsorbien protons cap a la sang i secretaven bicarbonat cap a l'orina, IC- β , en diferenciar-se terminalment i esdevenir IC- α , són capaces de secretar protons cap a l'orina i absorbir grups bicarbonats cap la circulació per tal compensar**

l'acidosi de l'organisme. Una de les proteïnes que regula la polimerització de Hensin és Gal-3 que a partir del seu domini lectina interacciona amb la proteïna i l'oligomeritza (Hikita 1999), la qual cosa és crítica per la diferenciació cel·lular (Mollenhauer, Deichmann et al. 2003). El KO de *dmbt1* generat per confirmar els anteriors resultats va resultar ser deleteri entre els estadis E4.5 i E5.5 del bastòcit, coincidint amb el moment que les cèl·lules es diferencien per formar epitelis columnaritzats. Aquests resultats reforcen el paper que s'atribueix a *dmbt1* en la diferenciació cel·lular, i li otorgarien una funció ja ens els primers estadis del desenvolupament. La participació de DMBT1 en processos de diferenciació concorda amb l'observació que *DMBT1* actua com a un gen supressor de tumors, en tant que el càncer és un procés de desdiferenciació cel·lular. El ratolí KO del mateix gen generat posteriorment no ha reproduït els resultats obtinguts pel primer, sinó que donaven lloc a animals viables però amb la fisiologia pancreàtica alterada (De Lisle, Xu et al. 2008). Existeix la possibilitat que les diferències observades sorgeixin degut a divergències en l'estartègia del clonatge i/o en el fons genòmic de les diferents cèl·lules mare emprades en cada estudi. Malgrat la necessitat de realitzar més treballs per tal de precisar acuradament la participació de *dmbt1* en els primers estadis del desenvolupament de l'organisme, la relació existent entre la diferenciació cel·lular i la proteïna és clara. No només el patró d'expressió de DMBT1 (per exemple en les criptes intestinals, allí on es localitzen les cèl·lules progenitores de l'epiteli) apunta en aquesta direcció, també ho fan investigacions realitzades amb la línia cel·lular AGS derivada d'un adenocarcinoma d'origen gàstric. Estudis *in vitro* van mostrar que l'expressió de DMBT1 es trobava atenuada, o es regulada a la baixa, en cèl·lules AGS diferenciades mitjançant l'estimulació amb PMA (Kang and Reid 2003). A més, s'ha observat que tant la manca o reducció de l'expressió de DMBT1 com l'augment de la mateixa s'han detectat en càncers gastrointestinals i de pulmó (Mollenhauer, Helmke et al. 2002). Amb tot, en alguns casos, com el càncer de pròstata, sembla ser que la seva implicació és molt residual (Ma, Takito et al. 2001). Així doncs, moltes publicacions connecten DMBT1 amb processos de desenvolupament epitelial, en tant que les neoplàsies s'originen per disfuncions en la proliferació i

diferenciació cel·lular. A més, *dmbt1* és un gen molt inestable en els tumors, degut a l'elevat nombre de repeticions que conté la seva seqüència nucleotídica (Mollenhauer, Holmskov et al. 1999).

La participació de DMBT1 en la immunitat innata i la promoció de la diferenciació cel·lular, així com el seu gran tamany i la gran capacitat que té per interaccionar amb tot tipus de molècules, ha portat alguns autors a proposar un model segons el qual DMBT1 seria el perfecte pont entre la defensa de les mucoses i la regulació del desenvolupament dels mateixos epitelis. **Segons aquest model, les anomalies en DMBT1 poden derivar en problemes en la integritat de les mucoses (inflamació). Al seu torn, un estat d'inflamació crònic pot resultar en una desregulació de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules, que finalment desembocaria en tumorogènesi** (Mollenhauer, Herbertz et al. 2000). Cal reconèixer, però, que degut a la gran complexitat funcional de la molècula, a més del seu enorme potencial mitjançant interaccions proteïna-proteïna, proteïna-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular, es requereixen més estudis funcionals per il·lustrar el paper exacte de DMBT1. Això és: conèixer els mecanismes moleculars que dirigeixen la funció de DMBT1, tenint en compte com aquesta varia segons el moment en que s'expressa i la seva localització en l'organisme. Tot aquest coneixement servirà per determinar millor quin és el rol de DMBT1 i fins a quin punt la seva disfunció és causa o conseqüència dels processos cel·lulars abans esmentats.

Hipòtesi de treball i Objectius

Hipòtesi de treball

El grup B de la SRCR-SF presenta característiques moleculars i funcionals diverses. Aquest creixent grup de proteïnes està representat en diferents espècies, desde les més primitives fins a les més evolucionades. A més, abasta molècules secretades i/o de membrana, que s'expressen durant estadis embrionaris i/o adults i en cèl·lules relacionades amb el sistema immunitari i/o d'altres. L'única característica comuna que existeix entre elles és que totes són proteïnes extracel·lulars que presenten un o més dominis SRCR del grup B.

El domini SRCR és un mòdul proteic que es caracteritza per presentar una conformació molt conservada, on la disposició dels aa que formen el seu core li confereix una gran estabilitat. Alhora, els aa més superficials del mòdul proteic han evolucionat d'una manera relativament lliure, sense afectar a la totalitat de l'estructura, gràcies a la esmentada estabilitat conformacional del core. Les variacions en els grups amoniàcids més exposats haurien permès al domini SRCR la possibilitat d'establir un gran ventall d'interaccions amb diferents tipus de lligands. Donades les diverses possibilitats que ofereix el mòdul SRCR, aquest hauria estat seleccionat al llarg de l'evolució per formar part de tot tipus de proteïnes: receptors de membrana, proteïnes solubles i/o immobilitzades a l'ECM.

El fet que el domini SRCR pugui establir interaccions amb molts tipus de lligands i formi part de proteïnes implicades en diversos processos biològics, ha dificultat la identificació d'una funció comuna per a tots els membres de la SRCR-SF, que unifiqués la família i permetés una investigació sistemàtica de la mateixa. De moment, ni el grup de molècules heterogeni que forma la SRCR-SF ni el mateix domini SRCR disposen d'una funció unificadora. Tot i que, diversos membres de la família estan implicats en la regulació del desenvolupament i del sistema immune, tant l'innat com l'adaptatiu, la funció exacta de molts d'ells encara s'ha de determinar. I en alguns casos, es desconeix si les activitats que

se'ls atribueixen es localitzen en els seus dominis SRCR o en altres regions de la proteïna.

En els darrers anys, però, s'ha vist que un nombre creixent de membres de la SRCR-SF, i principalment del grup B, actuaven com a PRRs. Però en cap cas aquesta funció sembla ser l'única, sovint la proteïna també és capaç de realitzar altres funcions, com per exemple modular la inflamació i/o participar en la diferenciació cel·lular.

A la llum d'aquestes evidències ens vam proposar caracteritzar estructural i funcionalment dos nous membres del grup B SRCR-SF identificats al nostre grup de recerca, analitzant des del patró d'expressió que presenten fins a les interaccions que poden establir. En tot moment s'ha tingut com a model i referència les propietats estructurals i funcionals reportades per a d'altres membres ja coneguts de la SF-SRCR i especialment per a DMBT1/Hensin/SAG/gp340 un membre paradigmàtic d'aquest grup de receptors.

Objectiu general

Caracteritzar l'estructura i la funció de nous membres solubles del grup B de la superfamília de *Scavenger Receptor Cysteine Rich* (SRCR-SF) identificats pel nostre grup: un no previament reportat (mS5D-SRCRB) identificat a ratolins i un altre previament reportat (hS4D-SRCRB) en humans.

Objectius específics

1. Caracteritzar l'estructura i el patró d'expressió tant a nivell de RNA com de la proteïna d'un nou gen murí (mS5D-SRCRB), que codifica per a un nou receptor soluble de la SF-SRCR.
2. Expressar i caracteritzar molecularment formes recombinants i naturals de les proteïnes mS5D-SRCRB i hS4D-SRCRB.
3. Estudiar el possible paper funcional de mS5D-SRCRB i hS4D-SRCRB tant pel que fa a la defensa innata com a d'altres aspectes del funcionalisme tisular i cel·lular.

Capítol I

Molecular and functional characterization of mouse S5D-SRCRB: a new group B member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily.

Cristina Miró-Julià^{*,1}, Sandra Roselló^{†,1}, Vanesa G. Martínez^{*}, Dorte R. Fink[‡], Cristina Escoda-Ferran^{*}, Olga Padilla[†], Citlali Vázquez-Echeverría^x, Paula Espinal-Marin[‡], Cristina Pujades^x, Angeles García-Pardo^{ll}, Jordi Vila[‡], Carles Serra-Pagès^{†,#}, Uffe Holmskov[‡], José Yélamos^{**} and Francisco Lozano^{†,#}

^{*}Centre Esther Koplowitz, Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, 08036 Barcelona, Spain; [†]Servei d'Immunologia and Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain; [‡]Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, 5000 Odense, Denmark; ^xDepartament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; ^{ll}Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain; [‡]Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; [#]Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; and ^{**}Servei d'Immunologia, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques, 08003 Barcelona, Spain

¹C.M.-J. and S.R. contributed equally to this work.

J Immunol. 2011 Feb 15;186(4):2344-54. Epub 2011 Jan 7.

PMID: 21217009 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Resum. Els membres de la superfamília de receptors *scavenger* rics en cisteïna (SRCR-SF) són proteïnes de membrana i/o secretades que exhibeixen una o diverses repeticions d'un mòdul proteic d'uns 100 a.a, anomenat SRCR. Existeixen dos tipus de dominis SRCR (l'A i el B), que es diferencien entre si pel nombre d'exons que el codifiquen i de cisteïnes intradomini. Tot i que no es coneix una funció unificadora pels membres de la SRCR-SF, la capacitat de reconèixer patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) ha estat descrita per alguns d'ells. En aquest article, es reporta la caracterització estructural i funcional d'un nou membre del grup B d'origen murí. El gen que codifica per *s5d-srcrb* es troba en el cromosoma 7, s'expandeix més de 15kb i està format per 14 exons. La seqüència de cDNA més llarga trobada té una longitud de 4.286 bp i codifica per una proteïna de 1.371 a.a, amb un pes molecular predit de 144,6 kDa. Emprant un sistema d'expressió episomal per mamífers, es va produir una forma glicosilada soluble i recombinant d'un pes molecular superior als 200 kDa, la qual va permetre generar anticossos monoclonals de rata específics contra la forma soluble. Anàlisis realitzats per tècniques de immunohistoquímica i per PCR a temps real mostraren que S5D-SRCRB presenta una expressió significativa en els tractes genitourinari i digestiu del

ratolí. S'ha observat que S5D-SRCRB s'uneix a proteïnes endògenes de la matriu extracel·lular (laminina i galectina-1), així com a PAMPs propis de bacteris Gram-negatius i Gram-positius i fongs. La unió de S5D-SRCRB a PAMPs induïx l'agregació microbiana i subsegüentment l'alliberament induït per PAMPs de citocines. Aquestes capacitats suggereixen que S5D-SRCRB podria tenir un paper en la defensa innata i en l'homeòstasi de certes superfícies epitelials especialitzades.

Molecular and Functional Characterization of Mouse S5D-SRCRB: A New Group B Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily

Cristina Miró-Julià,^{*,1} Sandra Roselló,^{†,1} Vanesa G. Martínez,^{*} Dorte R. Fink,[‡] Cristina Escoda-Ferran,^{*} Olga Padilla,[†] Citlali Vázquez-Echeverría,[§] Paula Espinal-Marin,[¶] Cristina Pujades,[§] Angeles García-Pardo,^{||} Jordi Vila,[¶] Carles Serra-Pagès,^{†,##} Uffe Holmskov,[‡] José Yélamos,^{**} and Francisco Lozano^{†,##}

The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF) members are transmembrane and/or secreted receptors exhibiting one or several repeats of a cysteine-rich protein module of ~100 aa, named scavenger receptor cysteine-rich (SRCR). Two types of SRCR domains (A or B) have been reported, which differ in the number of coding exons and intradomain cysteines. Although no unifying function has been reported for SRCR-SF members, recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) was recently shown for some of them. In this article, we report the structural and functional characterization of mouse S5D-SRCRB, a new group B member of the SRCR-SF. The *s5d-srcrb* gene maps at mouse chromosome 7 and encompasses 14 exons extending over 15 kb. The longest cDNA sequence found is 4286 bp in length and encodes a mature protein of 1371 aa, with a predicted *M_r* of 144.6 kDa. Using an episomal mammalian-expression system, a glycosylated soluble recombinant form >200 kDa was obtained and used as immunogen for the generation of specific rat mAbs. Subsequent immunohistochemical and real-time PCR analysis showed significant S5D-SRCRB expression in murine genitourinary and digestive tracts. S5D-SRCRB was shown to bind endogenous extracellular matrix proteins (laminin and galectin-1), as well as PAMPs present on Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. PAMP binding by S5D-SRCRB induced microbial aggregation and subsequent inhibition of PAMP-induced cytokine release. These abilities suggest that S5D-SRCRB might play a role in the innate defense and homeostasis of certain specialized epithelial surfaces. *The Journal of Immunology*, 2011, 186: 2344–2354.

The innate immune system represents the first line of host defense for multicellular organisms to maintain homeostasis of the internal environment against foreign pathogens (microorganisms, chemicals), as well as altered self-components (1). To do this, the humoral (i.e., complement) and the cellular (e.g., mucocutaneous barriers, macrophages) arms of the innate immune system are equipped with a set of inborn (germline encoded) receptors named pattern recognition receptors (PRRs). These PRRs recognize a relatively small spectrum of highly conserved structures of protein, saccharide, lipid, and nucleic acid nature of endogenous and exogenous origin. Typically, PRRs recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are conserved components essential for pathogen survival and are not shared by the host. Examples of PAMPs include

LPS from Gram-negative bacteria, lipoteichoic acid (LTA) and peptidoglycan (PGN) from Gram-positive bacteria, dsRNA from virus, lipoarabinomannan from mycobacteria, and mannan and β -glucan from fungi. Recognition of PAMPs by PRRs usually initiates an inflammatory cascade that involves recruitment of leukocytes to the site of infection, activation of antimicrobial effector mechanisms, and induction of adaptive immune responses that promote clearance of infection and long-term immune memory. In this way, the mammalian immune system eliminates invading pathogens with maximal efficacy and minimal damage to self (2). There are two main groups of PRRs: secreted molecules that circulate in blood and lymph and cell-surface receptors present on hemopoietic and epithelial cells. Each group is formed by several classes of PRRs, which have emerged and coevolved

*Centre Esther Koplowitz, Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, 08036 Barcelona, Spain; [†]Servei d'Immunologia and Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain; [‡]Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, 5000 Odense, Denmark; [§]Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; ^{||}Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain; [¶]Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; [¶]Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; and ^{**}Servei d'Immunologia, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques, 08003 Barcelona, Spain

[†]C.M.-J. and S.R. contributed equally to this work.

Received for publication March 15, 2010. Accepted for publication November 19, 2010.

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education (SAF 2007-62197 to F.L.), the Generalitat de Catalunya (Grants 2009/SGR/524 to J.Y. and 2009/SGR/252 to F.L.), and the Spanish Research Network on Infectious Diseases (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, RD06/0008/1013 to F.L.).

C.M.-J. and C.E.-F. are recipients of fellowships from the Spanish Ministry of Education (FPU AP2007-02223 and FPI BES2008-005544, respectively).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Francisco Lozano, Centre Esther Koplowitz, Rosellón 149–153, 08036 Barcelona, Spain. E-mail address: flozano@clinic.ub.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: EST, expressed sequences tagged; GST-Gal1, GST-Galectin 1; HA, hemagglutinin; IHC, immunohistochemistry; LTA, lipoteichoic acid; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PGN, peptidoglycan; PRR, pattern recognition receptor; PST, Pro, Ser, and Thr; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; rmS5D-SRCRB-HA, recombinant hemagglutinin-tagged mouse S5D-SRCRB; RT-qPCR, real-time retrotranscription quantitative PCR; SAG, salivary agglutinin; S5D-SRCRB, soluble protein with 5 domains of the scavenger receptor cysteine-rich type B group; SRCR, scavenger receptor cysteine-rich; SRCR-SF, scavenger receptor cysteine-rich superfamily; TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

independently, giving rise to structurally and functionally different molecules, although with cooperative and complementary defensive and homeostatic functions. Examples of PRRs include proteins with leucine-rich repeats (i.e., TLRs), C-type lectin domains (i.e., dectin-1, DC-SIGN), and scavenger receptors (i.e., SR-AI/II, CD36, MARCO).

The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF) is an ancient and highly conserved group of membrane-bound and/or soluble proteins mostly reported in the animal kingdom, from low invertebrates to mammals (3–5), as well as in some aquatic plants [i.e., unicellular green alga (6)]. In mammals, SRCR-SF members can be expressed by hemopoietic and nonhemopoietic cells, at embryonic and adult developmental stages, depending on species and tissue type. These proteins were reported to play a role in the regulation of innate and adaptive immune responses, as well as in the development of the immune system (3–5). Members of the SRCR-SF are characterized by the presence of one or several repeats of a highly conserved cysteine-rich extracellular scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain (~100–110 aa in size), which was first reported on the mouse macrophage scavenger receptor type I (SR-AI) (7). Depending on the number of cysteine residues present in the SRCR domain and the number of exons coding for each domain, the SRCR-SF can be divided into two mutually exclusive groups: A and B. Group A contains SRCR domains encoded by two or more exons and including six cysteines forming three disulphide bonds, whereas group B domains are encoded by a single exon and contain eight cysteines forming four disulphide bonds (3–5).

The extracellular regions of SRCR-SF members may present as exclusively composed of SRCR domains repeated in tandem or as multidomain mosaic proteins in which the SRCR domains seem to be combined with other types of protein modules, such as epithelial growth factor, C1r/C1s Ue/gf Bmp1, zona pellucida, collagenous regions, fibronectin, and short consensus repeats. The presence of short Pro, Ser, and Thr (PST)-rich polypeptides interspaced with contiguous SRCR domains is also frequently observed among SRCR-SF members. Available three-dimensional structures obtained from crystallization experiments indicate that group A and B SRCR domains present a highly conserved and compact core folding (a curved six-stranded β sheet cradling an α helix) with variable outer loop regions, likely giving rise to functional diversity (8–13).

Despite the overall structure conservation of the SRCR domains across different species, no unifying biological function has been reported. They do not possess enzymatic activity; however, some SRCR domains have been involved in protein–protein interactions, the best studied examples being those of CD6 with CD166/ALCAM (4) and CD163 with the haptoglobin–hemoglobin complex (14). In recent years, a number of studies also supported the recognition of PAMPs by some, but not all, group A (i.e., MARCO) (15) and B (i.e., DMBT1/SAG/gp340, Sp α , CD6, CD5, and CD163) (16–20) SRCR-SF members. Group B is composed of about a dozen members expressed in mammals by immune cells, such as macrophages (i.e., CD163/M130, CD163L1/M160, Sp α /AIM) or lymphocytes (i.e., CD5, CD6, SCART, WC1), as well as by cells of the gastrointestinal, respiratory, and genitourinary tracts (i.e., DMBT1/SAG/gp340, S4D-SRCRB, 18-B) (5, 21). The present work reports on the characterization, at the molecular and functional levels, of S5D-SRCRB (soluble 5 domain SRCR type B), the mouse homolog of a recently cloned human soluble member belonging to group B of SRCR-SF (SSc5D), for which no biochemical and functional data are available (22). By generating a recombinant protein form and a set of specific mAbs, we showed that mouse S5D-SRCRB is a secreted glycoprotein with a restricted tissue-expression pattern (mainly cells of the genitourinary and digestive

tracts), which is able to bind to endogenous extracellular matrix components (laminin, galectin-1), as well as to constitutive components of bacterial (Gram-negative or -positive) and fungal (saprophytic and pathogenic) surfaces. These data argue in favor of mouse S5D-SRCRB being a component of the humoral arm of the innate immune system likely involved in the defense and homeostasis of host epithelial surfaces.

Materials and Methods

Reagents

PBS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) contained 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ (pH 7.4). TBS contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl. Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer contained 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with complete protease inhibitors (Roche Diagnostics), and 1 mM Na₃VaO₄.

Cell lines

The human embryonic kidney cell line HEK 293-EBNA, which stably expresses the EBNA-1 Ag from EBV, was kindly provided by Takako Sasaki (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany). HEK 293 cells stably expressing TLR2 were a kind gift from Dr. Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA). HEK 293-EBNA cells were grown in DMEM/F12 (Life Technologies Life Science, Grand Island, NY) supplemented with antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 10% heat-inactivated FCS (Walkersville, MD), and 250 μ g/ml Geneticin (Life Technologies).

Identification and genomic characterization of s5d-srcrb

Bioinformatic tools available in public databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were used to search for new members of group B of the SRCR-SF. The high-throughput genome sequences and the nonredundant database sections of GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) were screened using the TBLASTN algorithm with the protein sequences of CD5 and CD6 as templates (Acc. No. X04391 and U34623, respectively). Mouse genomic clones with significant similarities (Evalue < 10⁻¹⁰) were selected and analyzed through the BLASTN algorithm against the mouse expressed sequences tagged (ESTs) database of GenBank. The ESTs or full-length clones of interest were obtained from distribution centers already cloned into pFLCI and were further sequenced in both directions with the ABI PRISM dRhodamine terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems, Warrington, U.K.) using universal M13 primers (M13-20.Fw 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; M13.Rv 5'-AACAGC-TATGACCATG-3'). The AK079906 or A430110N23 full-length cDNA sequences (gi: 26348280) were used for mouse chromosome mapping of *s5d-srcrb* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Similarly, determination of exon/intron boundaries was done by alignment of AK079906 with the mouse genomic sequence AC0794876 (gi: 9964851) using the BLAST2 tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Cloning and expression of s5d-srcrb

The full-length cDNA of *s5d-srcrb* tagged with a C-terminal hemagglutinin (HA) sequence was cloned into a modified version of the pCEP-Pu/AC7 mammalian expression vector (kindly provided by Takako Sasaki, Max-Planck-Institut für Biochemie). To this purpose, the AK079906 full-length cDNA sequence was used as a template for PCR amplification (Taq Expand High Fidelity Polymerase System; Roche Diagnostics) with the specific primers msd1.Fw (5'-CCCAAGCTTTCAGCAGCTGCTTCCCTC-CCT-3') and msd2.Rv (5'-GAAGATCTCACATCTCCCCTCAGAGGC-CT-3') containing HindIII and BglII restriction sites, respectively (underlined). The cycling conditions were one step of 95°C for 5 min; 35 cycles of 95°C for 45 sec, 63°C for 45 sec, and 72°C for 4 min 30 sec; and a final extension step of 72°C for 10 min. The resulting PCR product was purified (PCR purification kit, Qiagen, Hilden, Germany) and then digested with HindIII and BglII (MBI Fermentas, Glen Burnie, MD). The restricted product was gel purified (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) and cloned into an appropriately digested (HindIII and BamHI) pCep-Pu/AC7-HA tag vector using the T4 DNA Ligase (Takara, Shiga, Japan). The ligation products were transformed into DH5 α *Escherichia coli*-competent cells, and the resulting clones were checked by sequencing in both directions with vector-specific primers and the Prism Ready Reaction Big Dye Deoxy Terminator sequencing kit (PE Applied Biosystems). HEK293-EBNA cells were transfected with the above-mentioned construct using

Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Paisley, U.K.), according to the manufacturer's protocol. Transfectants were selected 48 h later in DMEM/FCS/Geneticin plus 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin (Sigma, St. Louis, MO) and left to grow to confluence. To perform protein-expression analysis, confluent transfectants were cultured in serum-free DMEM/F12 medium (without selecting antibiotics), and supernatants were collected every 48–72 h; storage of supernatants was at -20°C after supplementation with 0.5 mM PMSF, 0.02% sodium azide, and 2.5 mM EDTA. Supernatant samples (1.5 ml) were precipitated with TCA and run over 6–8% SDS-PAGE under reducing conditions, followed by electrotransfer to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). For Western blot analysis, membranes were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing 10% nonfat milk and then incubated with a mouse anti-HA mAb (cat. #sc-7392; Santa Cruz, Santa Cruz, CA). After extensive washing with PBS 0.01% Tween20, membranes were further incubated with a 1:1000 dilution (in blocking buffer) of HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Fairfield, CT). Blots were visualized by chemiluminescence with Supersignal West Dura Extended Duration Solution (Pierce, Rockford, IL).

Real-time retrotranscription quantitative PCR assays

Analysis of the expression pattern of *s5d-srcrb* was performed in C57BL/6J mouse tissues by real-time retrotranscription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent method, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using the GeneAmp PCR kit (Roche). Briefly, 0.5–1 μg total RNA was mixed with 2.5 μM oligo-d(T)16 primer, 1 mM 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates, 1 \times PCR Buffer II, and 5 mM MgCl_2 . After denaturing for 5 min at 65°C , 20 U RNase inhibitor and 50 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase were added (total reaction volume, 20 μl). The reaction was incubated for 90 min at 42°C and stopped for 15 min at 99°C . cDNA integrity was checked by PCR using primers specific for the housekeeping *18S* gene (18S.Fw: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' and 18S.Rv: 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3') and *s5d-srcrb* gene (mS5D.Fw: 5'-AAGACGTGGTGCTCACCTGC-3' and mS5D.Rv: 5'-TCCCACGTCCAG-AAGACTC-3') using the following cycling conditions: 2 min at 93°C , followed by 30 cycles of 93°C for 45 s, 56°C for 45 s, and 72°C for 5 min. For RT-qPCR, the same *s5d-srcrb* and *18S* gene-specific primers were used in a reaction mixture of cDNA (2 μl ; 1:100 diluted) and LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche Diagnostics). Reactions were carried out on an ABI 7900HTT FastReal Time PCR System (Applied Biosystems) under the following cycling conditions: 10 min at 95°C , 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Gene expression was normalized to *18S* and expressed in arbitrary units.

Generation of rat anti-S5D-SRCRB mAbs

For immunization purposes, each Sprague-Dawley rat was injected i.p. fortnightly with TCA precipitates from 12 ml FCS-free supernatant samples of recombinant HA-tagged mouse S5D-SRCRB (rmS5D-SRCRB-HA)-producing stable HEK 293-EBNA transfectants. In brief, FCS-free supernatant was precipitated in 14% TCA and 0.14% Triton X-100 for 10 min on ice and then pelleted at 14,000 rpm for 30 min at 4°C , washed with cold acetone, and resuspended with PBS. The first dose of Ag was emulsified with CFA (Sigma), and the next two immunizations were emulsified with IFA (Sigma). The spleen was removed at day 3 after i.v. injection of the Ag without adjuvant, and cells were fused with the non-Ig-secreting myeloma X63-Ag8.653 using polyethylene glycol 1500 (Sigma) (23). Hybridomas were selected by growth in RPMI 1640 culture medium (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD) containing hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (10) (Sigma) and supplemented with 12% FCS (Life Technologies, Invitrogen), 2 mM glutamine (Life Technologies, Invitrogen), 1 mM pyruvate (Sigma), 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Hybridoma cell supernatants were analyzed by ELISA using plates coated with FCS-free rmS5D-SRCRB-HA supernatants and HRP-conjugated goat anti-rat IgG antiserum (Sigma). Anti-rmS5D-SRCRB-HA-reactive hybridomas were subcloned twice by limiting dilution after discarding their reactivity against the HA tag. The immunoreactivity of the mAb obtained was analyzed by different immunochemical techniques (immunoprecipitation, ELISA, and Western blot).

Western blot detection of mouse S5D-SRCRB in cell transfectants and tissues

Tissue samples from C57BL/6J males were snap-frozen in liquid nitrogen and then weighed, minced, and mixed with three volumes of RIPA lysis buffer for homogenization with a Teflon-glass Dounce, followed by sonication with two short bursts (2 s) in a Branson Sonifier 250 (Danbury, CT).

Tissues were kept on ice for 20 s in between bursts. After clarification at 12,000 rpm for 20 min at 4°C , total protein content from supernatants was quantified by the Bradford method (BCA Protein assay kit; Pierce), as recommended by the manufacturer. For control purposes, 1×10^7 HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA were lysed following the same procedure. Protein samples (100 μg) were resolved by 6–7.5% SDS-PAGE and then electrotransferred to a nitrocellulose membrane (BioRad, Durham, NC). Subsequently, Western blot analysis was performed using a 1:2 dilution of rat 1H11.A8.G2 hybridoma supernatant plus goat HRP-conjugated anti-rat IgG (Sigma), as previously described.

Deglycosylation assays

The rmS5D-SRCRB-HA was immunoprecipitated using serum-free rat anti-S5D-SRCRB 1H11.A8.G2 hybridoma supernatant previously adsorbed for 1 h at 4°C under orbital rotation with 50 μl a 50% (v/v) suspension (in PBS) of Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The beads were pulled down, washed three times with PBS, and incubated with serum-free rmS5D-SRCRB-HA supernatant for 1 h at 4°C under gentle rotation. The beads were washed again, as before, and treated with different glycosidase combinations from the Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (Sigma), following the manufacturer's instructions. The resulting products were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot, as described above.

Bacterial and fungal protein-binding assays

E. coli ATCC25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC29213 were obtained from the American Type Culture Collection. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* were kindly provided by the Cell Biology Unit of the University of Barcelona. The rest of the bacterial and fungal strains used in this study are clinical isolates characterized by the Department of Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, using standard biochemical procedures. Bacteria were grown overnight at 37°C in Luria-Bertani medium, and fungi were grown at 28°C in Sabouraud's medium with aeration, harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min, and resuspended in TBS to a final density of 10^{10} bacteria/ml or 10^8 fungi/ml. *Aspergillus fumigatus* was grown at 30°C in Sabouraud's for 1 wk, and the cells were resuspended in TBS to a final $\text{DO}_{530\text{nm}} = 0.2$, which corresponds to a final density of 10^8 fungi/ml. Under these conditions, the cell suspension was a mixture of mainly conidiophores, conidia, and filaments. Quantification was performed by plating bacteria and fungi dilutions on agar. For microbial-binding assays, aliquots $\sim 5 \times 10^7$ bacteria and $\sim 5 \times 10^6$ fungi were incubated for 1 h at 4°C under gentle orbital rotation with different amounts of serum-free supernatant from HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA in binding buffer (TBS plus 1% BSA and 5 mM CaCl_2) to a final volume of 0.5 ml. In parallel, 100 μl testis and liver lysates was incubated with $\sim 5 \times 10^7$ Gram-positive bacteria (*S. aureus*) in binding buffer to a final volume of 0.5 ml by gentle orbital rotation for 1 h at 4°C . The lysates were obtained from 95 mg tissue samples, minced, and mixed with three volumes of binding buffer for homogenization with a Teflon-glass Dounce, followed by sonication with two short bursts in a Branson Sonifier 250. Following incubation, microbial cells were pelleted and washed once with 0.5 ml binding buffer and twice with 0.5 ml TBS plus 5 mM CaCl_2 to remove nonspecifically bound proteins. The washed pellets were resuspended in reducing Laemmli's sample buffer for 15 min at 100°C and separated on 6–7.5% SDS-PAGE gels, followed by electrotransfer to a nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were subjected to Western blot analysis, as described above. Aggregation assays were performed using fresh overnight cultures of *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, and *Candida albicans* harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min and then resuspended in PBS to a final density of 10^{10} bacteria or 10^8 fungi per ml. FITC (Sigma) was dissolved in PBS to a concentration of 10 mM and then added to the bacterial/fungal suspensions to a final concentration of 1 mM for 30 min at room temperature. Following removal of excess unbound FITC by extensive washing with PBS, 10 μl FITC-labeled bacterial/fungal suspension (5×10^7 bacteria and 5×10^6 fungi) in TBS containing 5 mM CaCl_2 was incubated overnight at room temperature with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ affinity-purified rmS5D-SRCRB-HA or BSA. Then, 10 μl the samples was examined by fluorescence microscopy.

Galectin 1 protein-binding assay

The plasmid used for bacterial expression of GST-Galectin 1 (GST-Gal1) was kindly provided by Dr. Fu-Tong Liu (UC Davis, Davis, CA). Overnight cultures of transformed BL21 *E. coli* cells were diluted 1:10 in 500 ml Luria-Bertani broth supplemented with ampicillin (0.1 mg/ml) and grown for ~ 4 h at 37°C until $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0.8$. Then, expression of GST-Gal1 was induced by the addition of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (0.1

mM) for an additional 4 h. The bacterial cell pellet was subjected to three cycles of freezing/thawing and was sonicated and solubilized with 10% Triton X-100 in the presence of protease inhibitors (Complete; Roche). The clarified supernatant was mixed with Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) for 2 h at 4°C under gentle orbital rotation. The beads were then washed thoroughly with TBS 1% Triton X-100, resuspended in TBS, and kept at 4°C until used. GST-Gal1–Sepharose beads were incubated for 90 min at 4°C in blocking buffer (TBS plus 5% BSA). Then, 10 μ l 50% (v/v) beads were incubated overnight at 4°C with 25 μ l serum-free rmS5D-SRCRB-HA-containing supernatants in the presence or absence of increasing concentrations (3, 15, 30 mM) of competing sugars (lactose or sucrose). Beads were washed twice with TBS 0.01% Tween 20 and once with TBS alone to remove unbound protein. The proteins were eluted with Laemmli's sample buffer and separated on SDS-PAGE under reducing conditions for further Western blot analysis.

ELISA assays

Interaction of rmS5D-SRCRB-HA with PAMP was analyzed by coating 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) overnight at 4°C with 2 μ g/well purified LPS from *E. coli* K12 (InvivoGen, San Diego, CA), PGN (cat. #77140; Sigma), LTA from *S. aureus* (cat. #2515; Sigma), Zymosan A (cat. #4250; Sigma), glucan from bakers' yeast (cat. #g5011; Sigma), β (1 \rightarrow 3)-glucan (cat. #89862; Sigma), β -D-glucan (cat. #g6513; Sigma), or mannan (cat. #m7504; Sigma) in coating buffer (100 mM NaHCO₃ [pH 9.5]). Non-specific binding to plastic wells was prevented by incubation for 1 h at room temperature in blocking solution (PBS plus 3% BSA). Serial 2-fold dilutions of serum-free rmS5D-SRCRB-HA supernatants were added to the wells and incubated for 2 h at room temperature. Bound protein was detected by a 1-h incubation at room temperature with neat serum-free 1H11.A8.G2 rat hybridoma supernatant, followed by a 30-min incubation with a 1:1000 dilution of goat anti-rat IgG/HRP antiserum (Sigma). Between each incubation step, excess unbound proteins were washed off three times with PBS 0.01% Tween 20. Color was developed by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate (Sigma), and the absorbance was measured at 450 nm. The assay was repeated twice with similar results.

Interaction of rmS5D-SRCRB-HA with extracellular matrix proteins was analyzed by coating ELISA microtiter plates overnight at 4°C with 0.5 μ g/well purified fibronectin, laminin, collagen I, and collagen IV (supplied by Angeles García-Pardo, Centro de Investigaciones Biológicas-Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) in PBS (Roche). The assay conditions were the same as described above, with the exception that incubations were performed at 4°C, and the 4D11.A2.H4 hybridoma supernatant was used for detection purposes. The assay was repeated twice with similar results.

Immunohistochemical assays

Four-micrometer sections from neutral-buffered formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue blocks were mounted on ChemMate Capillary Gap Slides (Dako, Glostrup, Denmark), dried at 60°C, deparaffinized, and hydrated. Prior to Ag retrieval, blocking of endogenous peroxidase was performed in 1.5% hydrogen peroxide in TBS buffer (pH 7.4) for 10 min. Ag retrieval was carried out using microwave heating in target retrieval solution (Dako) or pepsin. Three Tissue-Tek containers (Miles, Elkhart, IN), each with 24 slides in 250 ml buffer, were placed on the edge of a turntable inside the microwave oven. Slides were heated for 11 min at full power (900 W) and then for 15 min at 400 W. After heating, slides were left in buffer for 15 min. Incubation with 1:10 diluted supernatants (in Ab Diluent S2022; Dako) from anti-S5D-SRCRB hybridomas (1H11.A2.G8, 4D11.A2.H4, 8F4.F3.F9, 5B7.B8.A1, 8C11.D6.C9, 7G4.E1.H7, and 5E12.G3.B1) was carried out for 60 min at room temperature. No immunostaining was seen when the primary Ab was omitted or substituted with an isotype control. Immunostaining was automated using the PowerVision+ HRP detection system DPVB+500HRP (ImmunoVision Technologies, Brisbane, CA) on the TechMate 500 instrument (Dako). DAB+ (K3468; Dako) was used as substrate-chromogen system. Immunostaining was followed by brief nuclear counterstaining in Mayer's hematoxylin. Finally, cover slips were mounted with AquaTex (Merck, Darmstadt, Germany).

IL-8-release assay

HEK 293 cells and HEK 293 cells stably expressing TLR2 were plated on a 96-well plate at a density of 5×10^4 cells/well for 24 h and then cultured in serum-free media for an additional 24 h. Cells were then pulsed with 20 μ g/ml PGN for 24 h in the presence of supernatants from HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA or from untransfected cells as a control. Culture supernatant samples (25 μ l) were collected and assayed

for human IL-8 by ELISA (BD OptEIA, Human IL-8 ELISA Set; BD Biosciences, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions.

Results

Identification and cloning of mouse s5d-scrb

The screening of GenBank databases with the CD5 and CD6 protein sequences rendered two *Mus musculus* P1-derived artificial chromosome genomic clones (Acc. No. AC079486 and AC079542) predicted to contain a gene coding for a protein containing several group B SRCR domains. Also identified were 69 EST clones with significant similarities (Evalue $< 10^{-10}$) to PAC genomic clones, 17 of which showed the highest score (Supplemental Table I) and were expressed in different tissues (muscle, brain, mammary gland, pancreas, liver, eye, gastrointestinal tract) and at different developmental stages (from embryo to adult). Two 4286 bp-long cDNA clones (Acc. No: AK079906 and A430110-N23) obtained from thymus tissue of C57BL/6J mice at day 0 of neonatal development were cloned into the pFLCI vector to be fully resequenced. They were shown to contain an open reading frame of 4116 bp encoding a polypeptide chain of 1371 aa (Acc. No: BAC37780 and NP_766596), with a predicted M_r of 144.6 kDa (Supplemental Fig. 1). This putative new protein (Acc. No: EU850434, gi: 194354452) contained a short leader peptide and five SRCR domains (each was \sim 100 aa in size) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd>). The N-terminal signal peptide sequence was 16 aa long, and the most likely signal peptidase cleavage site was IQA-IE (Signal IP 3.0; <http://www.cbs.dtu.dk>). Four Asn-X-Ser/Thr motifs were found, three of which (NETA, NSTA, and NTTS) are predicted to be N-glycosylated (NetNGlyc 1.0; <http://www.cbs.dtu.dk>). All five SRCR domains fulfilled the characteristics of group B (encoded by a single exon and containing eight properly spaced cysteines) (5) and were interspersed by short (between SRCR1–SRCR2, and SRCR3–SRCR4), intermediate (between SRCR4–SRCR5), or long (C-terminal to SRCR5) PST-rich regions. Multiple O-glycosylation sites were predicted, which were mainly located within the PST-rich sequences (NetOGlyc 3.1; <http://www.cbs.dtu.dk>) (Fig. 1A, 1B). The PST-rich region C-terminal to SRCR5 was predicted to contain a 155-aa-long sequence (from aa 1050–1205) with homology to syndecan domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd>). No transmembrane region could be predicted (TMHMM; <http://www.cbs.dtu.dk>), as would be expected for a secreted protein. The mouse gene encoding this cDNA sequence was named *s5d-scrb*, for soluble protein with 5 domains of the SRCR group B, and was mapped to chromosome 7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). It spans 15 kb and encompasses 14 exons (Fig. 1A). Exons 1 and 2 encode the 5'-untranslated region and the signal peptide. Exons 3, 6, 7, 9, and 11 encode each of the five SRCR domains as expected for group B members. Exons 4, 5, 8, and 10 encode the short and intermediate PST-rich intervening regions. Exons 12–14 encode the long PST-rich C-terminal region (encompassing the putative syndecan domain), the stop codon, and the 3'-untranslated region with the polyadenylation signal sequence (ACAAAA) at 14 bp upstream from the poly(A) tail.

Through the same bioinformatic tools used to identify *s5d-scrb*, a homologous gene mapping to an orthologous region of human chromosome 19 was also identified. It corresponds to a recently reported human gene (SSc5D), for which no biochemical and functional data are available (22). Multiple alignments of the amino acid sequences of the SRCR domains from the human and mouse genes show a high degree (\sim 60%) of interdomain, as well as interspecies amino acid identity (Fig. 1C). This indicates that the five SRCR domains may have arisen from exon duplication.

2348

CHARACTERIZATION OF MOUSE S5D-SRCRB

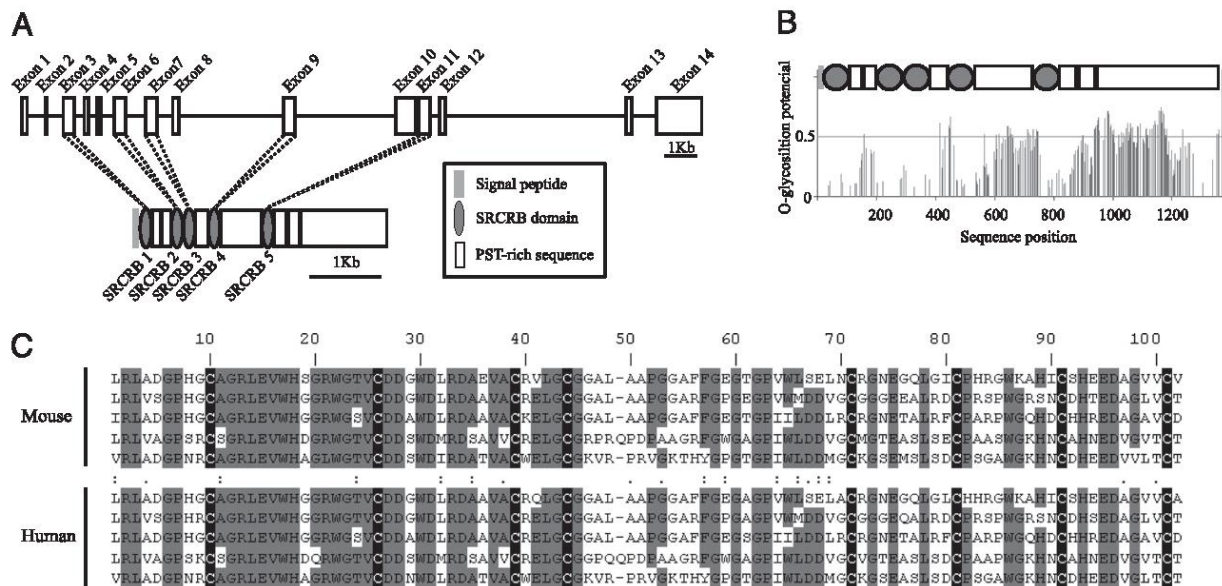


FIGURE 1. Gene and protein domain organization of mouse *s5d-srcrb*. **A**, The exon–intron organization of mouse *s5d-srcrb* and its correlation with the domain organization of the predicted cDNA. **B**, Location of putative *O*-glycosylation sites along the protein sequence, according to the NetOGlyc 3.1 software. **C**, Alignment of amino acid sequences of SRCRB domains from the predicted mouse and human S5D-SRCRB proteins. Conserved cysteine residues are shown in black boxes. The gray boxes correspond to regions with >80% amino acid conservation.

Expression of rmS5D-SRCRB-HA and generation of an S5D-SRCRB-specific rat mAb

The full-length cDNA sequence of mouse *s5d-srcrb* was fused in frame with a C-terminal HA tag and then cloned into the pCEP-Pu vector for further expression into HEK 293-EBNA cells. Serum-free supernatants from stable transfectants expressing this rmS5D-SRCRB-HA protein were precipitated using TCA, separated on SDS-PAGE under reducing conditions, and subjected to Western blot with an anti-HA mAb. This analysis rendered a single broad band of ~200 kDa in size (Fig. 2A), which is far greater than the predicted M_r (144.6 kDa) for the *s5d-srcrb* gene product. The difference between the observed and expected M_r argues in favor of rmS5D-SRCRB-HA undergoing posttranslational modifications. This was further confirmed by simultaneous Western blot analysis of cell solubilizates and culture supernatants from HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA. As seen in Fig. 2C, the intracellular form of rmS5D-SRCRB-HA was shown to display a smaller M_r (~150 kDa) than did the extracellular one (>200 kDa).

The rmS5D-SRCRB-HA present in serum-free supernatants from stable transfectants was used as immunogen to generate specific rat mAbs. After several cloning and subcloning steps, seven rat hybridomas were selected (Supplemental Table II). Their specificity was initially analyzed using ELISA plates precoated with serum-free rmS5D-SRCRB-HA-containing supernatants. None of the selected hybridomas was reactive to other HA-tagged group B SRCR-SF members' protein, such as S4D-SRCRB (24). The same results were obtained following immunoprecipitation and Western blot analyses of rmS5D-SRCRB-HA supernatant samples, further indicating that all rat mAbs generated recognized rmS5D-SRCRB-HA under native (ELISA, immunoprecipitation) and denaturing (Western blot) conditions; this suggests that the mAbs are likely recognizing lineal epitopes.

Glycosylation studies

Because the predicted amino acid sequence of mouse S5D-SRCRB contains multiple *N*- and *O*-linked glycosylation sites, the possibility that glycosylation could account for the above-mentioned

posttranslational modifications was assessed. rmS5D-SRCRB-HA was immunoprecipitated and then subjected to incubation with different glycosidases, either alone or in combination. As illustrated in Fig. 2B, little or no change in M_r was observed when rmS5D-SRCRB-HA was incubated with galactosidase, which releases only $\beta(1\rightarrow4)$ terminal galactose residues. Partial sensitivity could be observed to *N*-acetylglucosaminidase (Fig. 2B) and PNGase F (data not shown), as deduced from the generation of a faint band ~150 kDa, which is the predicted M_r for the unprocessed intracellular form of S5D-SRCRB. Because *N*-acetylglucosaminidase cleaves all terminal β -linked *N*-acetylglucosamine residues typical of *N*-linked glycosylations, and PNGase F cleaves all types of Asn-linked sugars, some degree of *N*-glycosylation can be inferred for S5D-SRCRB, which is in agreement with the presence of putative *N*-glycosylation sites. Combined digestion with neuraminidase and *O*-glycosidase induced a small reduction in the observed M_r of rmS5D-SRCRB-HA (Fig. 2B), which was similar to that observed for neuraminidase or *O*-glycosidase alone (data not shown). This indicates that S5D-SRCRB also undergoes some degree of *O*-glycosylation, as predicted from its relatively high content of PST-rich sequences. In parallel experiments, all of the glycosidases gave optimal digestion results when bovine fetuin was used as a control glycoprotein (data not shown). These results indicated that, although likely glycosylated, rmS5D-SRCRB-HA is also relatively resistant to glycosidase treatment, as has often been reported for some heavily glycosylated high M_r proteins (25, 26).

Tissue-expression analysis of s5d-srcrb

The expression pattern of S5D-SRCRB in normal mouse tissues was assessed by immunohistochemistry (IHC) and RT-qPCR assays. Of the seven rat hybridomas generated, two (4D11.A2.H4 and 1H11.A8.G2) were shown to be appropriate for IHC studies on paraffin-embedded tissues. The two mAbs gave identical staining results with different retrieval methods (pepsin or target retrieval solution). As illustrated in Fig. 3A, positive immunostaining was detected throughout the gastrointestinal and genitourinary tracts. Strong staining of serosal salivary gland and the exocrine part of pancreas, as well as of testis, was observed. In kidney, selective

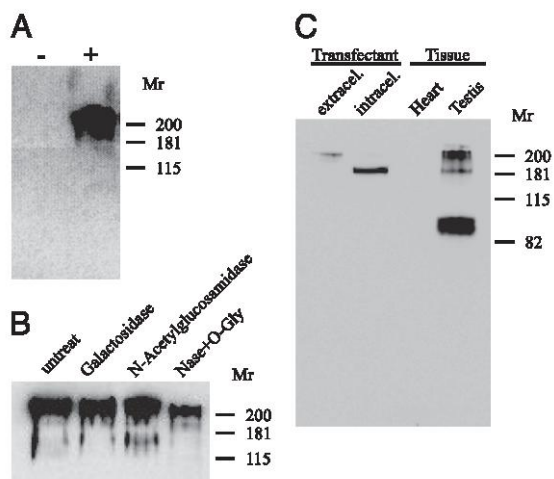


FIGURE 2. Analysis of recombinant and tissue-expressed mouse S5D-SRCRB. *A*, Expression of rmS5D-SRCRB-HA by human HEK 293-EBNA cells. Samples of TCA-precipitated serum-free culture supernatants from transfected (+) and untransfected (-) cells were run on 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to nitrocellulose for Western blot analysis with an anti-HA mAb plus HRP-conjugated anti-mouse IgG antiserum. *B*, Glycosylation analysis of rmS5D-SRCRB-HA. Serum-free culture supernatants from HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA were immunoprecipitated with 1H11.A8.G2 mAb. The immune complexes were then incubated for 3 h at 37°C with the indicated glycosidases, alone (galactosidase, *N*-acetylglucosaminidase) or in combination (neuraminidase plus *O*-glycosidase [Nase+*O*-Gly]). The resulting products were analyzed by Western blot using a 1:2 dilution of rat 1H11.A8.G2 hybridoma supernatant plus goat HRP-conjugated goat anti-rat IgG. *C*, Comparative Western blot analysis of recombinant and tissue-expressed mouse S5D-SRCRB. Samples of serum-free culture supernatants (extracel.) and detergent (1% Nonidet P-40) cell solubilizates (intracel.) from stable HEK 293-EBNA transfectants were analyzed in parallel with soluble fractions of RIPA homogenates from mouse heart and testis. Samples were run on 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to nitrocellulose for Western blot analysis, as in *B*.

staining of a few tubular structures (likely corresponding to the distal part of the collecting tubules) was observed. Lung and heart gave negative staining results. A few scattered positive cells were detected in spleen sections.

The RT-qPCR analysis of *s5d-srcrb* expression in normal mouse tissues was in agreement with the above-mentioned IHC results. Following normalization of gene expression to ribosomal *18S*, the greatest relative expression levels were observed in testis, kidney, and pancreas. Low or negative relative expression was detected in the rest of the analyzed tissues (Fig. 3*B*). Similar negative results were observed when bone marrow-derived monocytes (resting or LPS stimulated), and different cell lines of monocytic (Raw 264.7, B10R), lymphocytic (EL-4, X63), or epithelial (266.6) origin were analyzed (Supplemental Fig. 2). Taken together, these results illustrate the restricted cell- and tissue-expression pattern of *s5d-srcrb*.

The information obtained from tissue-expression assays was used to validate the specificity of the anti-S5D-SRCRB rat mAbs generated. Western blot analysis of RIPA solubilizates showed mAb-reactive bands in testis but not in heart tissue, used as negative control (Fig. 2*C*). Similar negative results were obtained in kidney and pancreas (data not shown), likely due to the low and restricted expression observed in kidney and the relatively high abundance of proteolytic enzymes present in exocrine pancreas. Interestingly, the higher M_r bands observed in testis had a similar M_r to those detected intra- and extracellularly in the transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA, used as positive control. A band

of lower M_r (~80 kDa) was also repeatedly observed in testis, likely representing an alternatively spliced isoform or a partially degraded form. Several attempts to immunoprecipitate S5D-SRCRB from testis and other positive tissues (pancreas, kidney) were unsuccessful. This indicated that the epitopes recognized by the anti-S5D-SRCRB mAbs are inaccessible in the endogenous protein under the solubilization conditions used (RIPA buffer) or, more likely, that the mAbs do not bind properly in the stringent solubilization buffer conditions used during RIPA-immunoprecipitation.

We also set out to study whether the expression of mouse S5D-SRCRB is regulated during embryo development. Preliminary in situ RNA-hybridization analysis carried out at day 9.5 postcoitum showed that S5D-SRCRB is selectively detected in placodes, embryonic ectodermal thickenings where organs or structures will develop (Supplemental Fig. 3). RT-qPCR experiments also showed a substantial increase in S5D-SRCRB RNA expression from days 9–14 postcoitum (Supplemental Fig. 4). These data suggested that the expression of S5D-SRCRB is developmentally regulated.

Pathogen-binding and aggregating properties of recombinant S5D-SRCRB

Given that some members of the SRCR-SF act as receptors for PAMPs, the microbial-binding properties of rmS5D-SRCRB-HA were assessed in vitro. Bacterial or fungal cell suspensions were incubated with serum-free rmS5D-SRCRB-HA-containing supernatants, and the presence of cell-bound protein was tested by Western blot. As shown in Fig. 4*A* (left panel), rmS5D-SRCRB-HA could be detected in cell pellets from most bacterial strains assayed, either Gram-negative (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*) or Gram-positive (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). Relatively low binding signal was observed for *A. baumannii*. In parallel assays, rmS5D-SRCRB-HA also bound to all of the fungal strains analyzed, either saprophytic (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) or pathogenic (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *A. fumigatus*) (Fig. 4*A*, right panel). In all cases tested, the binding of rmS5D-SRCRB-HA was dose dependent (Fig. 4*B*). In full agreement with its pathogen-binding properties, rmS5D-SRCRB-HA was also able to induce bacterial and fungal aggregation, an effective mechanism to avoid dissemination of pathogenic agents and, thus, to control infection. As shown in Fig. 5, addition of rmS5D-SRCRB-HA, but not BSA, to microbial suspensions induced aggregation of Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*, *A. baumannii*) bacteria, as well as fungi (*C. albicans*).

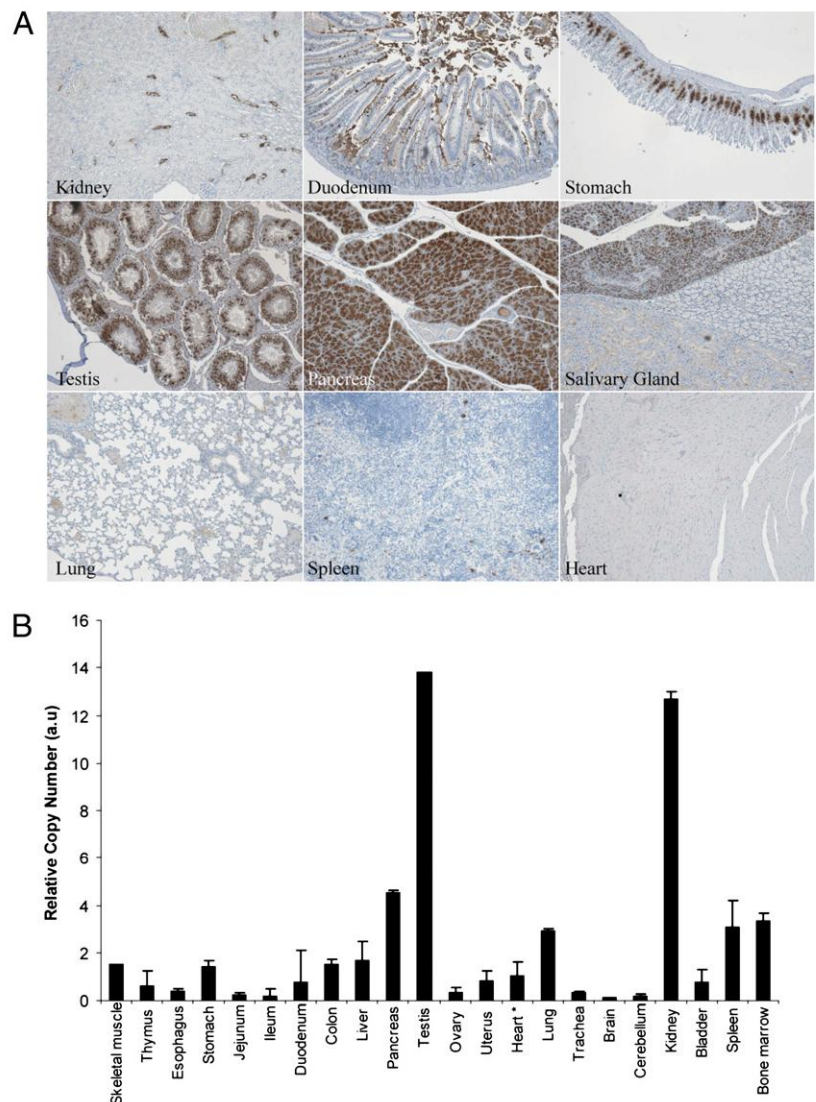
PAMP recognition by S5D-SRCRB

The nature of the cell wall component(s) responsible for the bacterial- and fungal-binding ability of mouse S5D-SRCRB was studied by ELISA. Plastic plates were coated with different PAMPs (PGN, LPS, LTA, zymosan, glucan, mannan) and then incubated with serum-free rmS5D-SRCRB-HA supernatants. The presence of bound rmS5D-SRCRB-HA was developed using anti-S5D-SRCRB rat mAb plus HRP-conjugated anti-rat IgG antiserum. As shown in Fig. 6, significant dose-dependent binding of rmS5D-SRCRB-HA could be detected to PGN, LPS, zymosan, and linear β -glucan but not to LTA, mannan, or branched β -glucans.

Binding of testis S5D-SRCRB proteins to microbial surfaces

Next, we also studied whether the endogenous mouse S5D-SRCRB protein form(s) expressed in testis also retain(s) the microbial-binding properties of the recombinant protein (rmS5D-SRCRB-HA). *S. aureus* was chosen for these studies because our results showed that it gave the best binding. Thus, bacterial cell sus-

FIGURE 3. Tissue-expression analysis of mouse S5D-SRCRB. *A*, Immunohistochemical staining of paraffin-embedded mouse tissue sections (kidney, duodenum, stomach, testis, pancreas, salivary gland, lung, spleen, and heart) with rat 4D11.A2.H4 mAb (1:10 dilution). Development was carried out with HRP-conjugated anti-rat IgG and nuclear counterstaining in Mayer's hematoxylin (original magnification $\times 10$). *B*, RT-qPCR analysis of mouse S5D-SRCRB tissue expression. RNA preparations from TRIzol-treated C57BL/6J adult mouse tissue were used as a template for cDNA synthesis with the GeneAmp PCR kit. Further amplification of *18S* and *s5d-srcrb* genes was performed as described in *Materials and Methods*. Relative gene copy number was normalized to housekeeping *18S* and expressed as arbitrary units with error bars from duplicates. A representative experiment of three performed is shown.



pensions were incubated with liver and testis tissue solubilizates and then pelleted, extensively washed, and resolved by SDS-PAGE under reducing conditions for further Western blot analysis. As shown in Fig. 4C, anti-S5D-SRCRB-reactive bands were recovered in *S. aureus* cell pellets adsorbed onto testis but not liver homogenates. The observed bands corresponded to the greatest (fully processed) and smallest (alternatively spliced or proteolytically processed) M_r forms of mouse S5D-SRCRB (Fig. 2C). No evidence of reactivity with the intermediate M_r (intracellular, incompletely processed) form was observed.

Inhibition of PAMP-induced cytokine release by S5D-SRCRB

Our results showed that rmS5D-SRCRB-HA bound to bacteria and was able to induce aggregation. We next studied whether rmS5D-SRCRB-HA has intrinsic bactericidal activity. As shown in Supplemental Fig. 5, our preliminary results suggested that rmS5D-SRCRB-HA does not display measurable bactericidal activity at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Similar results were obtained with rmS5D-SRCRB-HA concentrations ≤ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (data not shown).

We then sought to determine whether the interaction of S5D-SRCRB with PAMP could affect a biological outcome, such as cytokine release. HEK 293 cells stably transfected with TLR2 release IL-8 when exposed to PGN, a known PAMP and TLR2 ligand. We then exposed these cells, as well as untransfected HEK

293 cells, to PGN in the presence or absence of rmS5D-SRCRB-HA-containing supernatant. As shown in Fig. 7, release of IL-8 induced by PGN was dose-dependently inhibited by rmS5D-SRCRB-HA; inhibition was significant ($p < 0.05$) when 100 μl supernatant was used. Supernatant from untransfected HEK 293 cells did not affect IL-8 release by HEK 293 TLR2 cells (data not shown).

Binding of mouse S5D-SRCRB endogenous extracellular proteins

Archetypical members of the SRCR-SF (e.g., DMBT1/gp340/SAG) were reported to interact with exogenous pathogens, as well as with endogenous host components (27). Therefore, it was tested whether this could also be the case for S5D-SRCRB. First, we explored its binding to different purified extracellular matrix proteins by ELISA. As illustrated by the results presented in Fig. 8A, rmS5D-SRCRB-HA showed clear dose-dependent binding to laminin. Low (fibronectin) or negative (collagen I and IV) binding was observed for other extracellular matrix components. Another set of experiments demonstrated the sugar-dependent interaction of S5D-SRCRB with galectin-1, a broadly expressed homodimeric mammalian lectin secreted by epithelial cells (28). As shown in Fig. 8B, specific binding of rmS5D-SRCRB-HA to GST-Gal1 Sepharose beads was competed in a dose-dependent

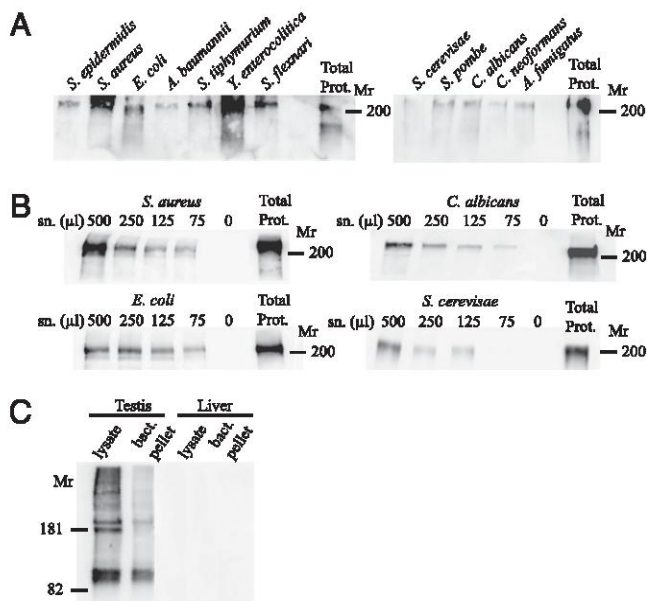


FIGURE 4. Binding of mouse S5D-SRCRB to microbial organisms. *A*, Direct binding assays of rmS5D-SRCRB-HA to bacterial and fungal strains. Samples (250 μl) of serum-free supernatants from stable transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA were incubated for 1 h at 4°C with the indicated bacterial (5×10^7) or fungal (5×10^6) cell suspensions in binding buffer (TBS, 1% BSA, 5 mM CaCl₂). Cell pellets were washed thoroughly and then resuspended in Laemmli's sample buffer for further separation in 6% SDS-PAGE. Cell-bound protein was subsequently detected by Western blot analysis, as described in *Materials and Methods*. *B*, Dose-dependent binding of rmS5D-SRCRB-HA to bacterial and fungal strains. Increasing amounts of serum-free supernatants from stable transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA were incubated with 5×10^7 Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria, as well as with 5×10^6 pathogenic (*C. albicans*) and saprophytic (*S. cerevisiae*) fungi. Bound protein was recovered and detected as described above. *C*, Binding of bacteria to tissue-expressed mouse S5D-SRCRB. Mouse testis and liver tissue was homogenized in three volumes of binding buffer (see above), and 100 μl of their soluble fractions was incubated for 1 h at 4°C with 5×10^7 *S. aureus*. Presence of cell-bound mouse S5D-SRCRB protein was analyzed by Western blot, as in *A*.

(3–30 mM) manner by lactose but not by another irrelevant sugar (sucrose). Taken together, the results indicated that, once secreted, S5D-SRCRB could be immobilized to relevant constituents of the extracellular milieu (e.g., laminin and galectin-1, and perhaps other unidentified proteins as well), thus putatively contributing to basic homeostatic epithelial cell functions.

Discussion

Epithelial cells form physical barriers that are covered by mucosal surfaces aimed at preventing the entry of invading pathogens. Moreover, spontaneously or following the sensing of microbial components, epithelial cells can also synthesize effector molecules that trigger or increase the defensive immune responses of the host (i.e., mucosal inflammation and other related innate and adaptive immune responses) (29–33). The present work reports the identification and further molecular and functional characterization of a new mouse receptor (S5D-SRCRB) mainly expressed by some epithelial cell types and likely belonging to the humoral arm of the innate immune system. This receptor possesses the characteristics of group B members of the SRCR-SF (3, 5), and it should be considered the mouse homolog of Ssc5D (22). A relevant finding of the current study is the demonstration that mouse S5D-SRCRB behaves as a PRR. Thus, S5D-SRCRB should be added to the

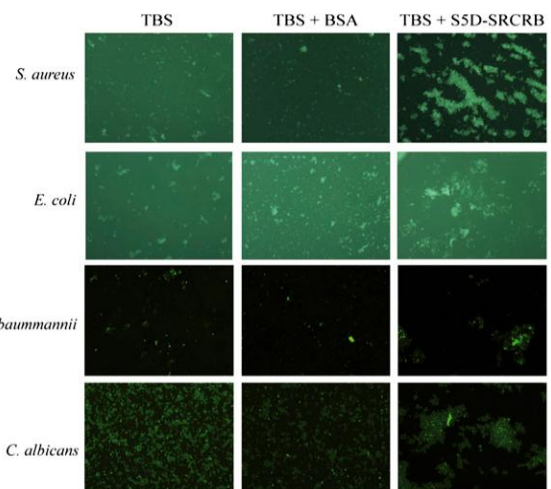


FIGURE 5. Aggregation of bacterial and fungal cell suspensions by mouse S5D-SRCRB. The indicated strains of bacteria and fungi were labeled with FITC and incubated overnight at room temperature with 20 μg/ml of affinity-purified rmS5D-SRCRB-HA or BSA, used as negative control. After extensive washing, the cells were observed by fluorescence microscopy. Original magnification $\times 100$.

short, although still-growing, list of members of the SRCR-SF showing pathogen-binding properties. This ability has been unequivocally mapped to the SRCR itself in only a few members, including MARCO, CD163, DMBT1/SAG/gp340, CD5, CD6, and

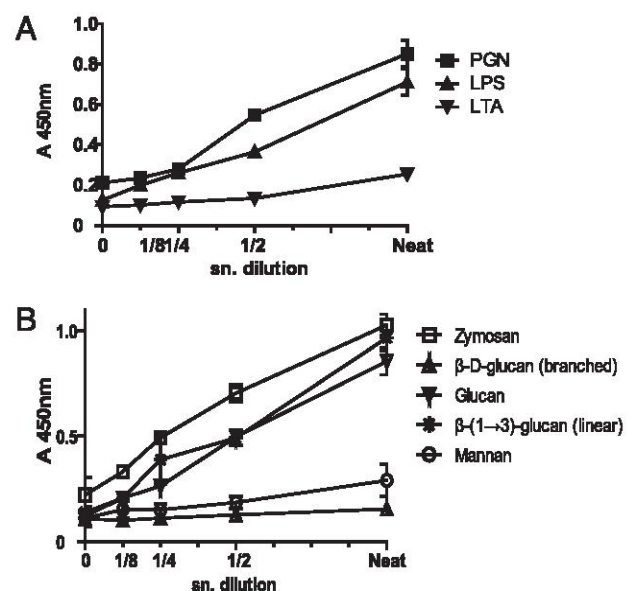


FIGURE 6. Binding of mouse S5D-SRCRB to conserved microbial cell wall components. *A*, Binding of rmS5D-SRCRB-HA to bacterial cell wall components. ELISA plates were coated overnight at 4°C with 2 μg/well of LPS, PGN, or LTA. After blocking with PBS 3% BSA, 2-fold serial dilutions of serum-free supernatants (100 μl) from transfectants expressing HA-tagged mouse S5D-SRCRB were added to wells and incubated for 2 h at room temperature. Bound protein was detected using 1H11.A8.G2 mAb plus HRP-conjugated goat anti-rat IgG antiserum. Plates were developed with TMB substrate solution, and additional absorbance was measured at 450 nm. *B*, Binding of rmS5D-SRCRB-HA to fungal cell wall components. ELISA plates were coated overnight at 4°C with 2 μg/well of zymosan, β-glucans (linear or branched), and mannan. After blocking, well plates were incubated for 2 h at room temperature with 100 μl samples of 2-fold serial diluted serum-free supernatants from transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA. Bound protein was detected as in *A*. The assays shown in *A* and *B* were repeated twice with similar results.

2352

CHARACTERIZATION OF MOUSE S5D-SRCRB

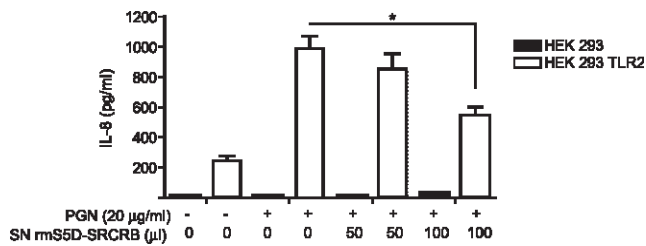


FIGURE 7. Downmodulation of PGN-induced IL-8 release by mouse S5D-SRCRB. HEK 293 cells that were untransfected or stably expressing TLR2 were seeded on a 96-well plate at a density of 5×10^4 cells per well, grown for 24 h, and then cultured in serum-free media for an additional 24 h. Cells were then pulsed with 20 µg/ml PGN for 24 h in the presence of supernatants from HEK 293-EBNA transfectants expressing rmS5D-SRCRB-HA or serum-free media as negative control. IL-8 was then assayed in culture supernatant samples by ELISA. Results represent the average of four independent experiments. * $p < 0.05$.

Sp α . In some instances, the amino acid sequence motifs involved in SRCR-mediated pathogen recognition have been precisely identified (RxR, VEVLxxxW) (15, 16, 20), but an exact match to these motifs is not observed among any of the SRCR domains of S5D-SRCRB. However, by no means does this exclude the SRCR domains of mouse S5D-SRCRB as being responsible for pathogen recognition, as exemplified by Sp α , CD6, and CD5 (17–19). The SRCR domains are among the few protein modules from which evolution has settled a myriad of structurally related but functionally different proteins. Key residues that stabilize the core structure of SRCR domains are well conserved, whereas amino acid positions at externally oriented connecting loops are keen to change, thus generating protein versatility. This versatility may have given rise to a certain degree of functional diversity among the members of the SRCR-SF that would justify the lack of a unifying function for all SRCR-SF members; this is exemplified even when exploring the pathogen-binding properties of SRCR-SF members. However, mutational investigations to exclude the possibility that the non-SRCR domains of S5D-SRCRB could account for its pathogen-binding properties remain to be performed.

Intriguingly, mouse S5D-SRCRB presents several structural and functional analogies with the human secreted protein DMBT1, also known as gp340 or salivary agglutinin (SAG), and which also corresponds to rat ebnerin, mouse Crp-ductin, or rabbit hensin (5). DMBT1/gp340/SAG is an archetypal group B SRCR-SF protein involved in infection, inflammation, and cancer (34). From a structural point of view, it is a mosaic-type glycoprotein composed of 14 SRCR domains interspersed by PST-rich sequences and possessing two C1r/C1s Uegf Bmp1 and one zona pellucida domains at its C-terminal region. Functionally, DMBT1/gp340/SAG represents an innate defense factor interacting with a broad spectrum of pathogens (bacteria, fungi, viruses), as well as mucosal defense proteins (galectins, IgA, surfactant A and D proteins, MUC5B, TFF2). In contrast, it drives epithelial and stem cell differentiation as an extracellular matrix protein, whereas inactivation of its gene is associated with tumor formation (34). Mouse S5D-SRCRB should also be considered a mosaic protein because it is composed of five SRCR domains interspersed by PST-rich sequences and possessing a C-terminal syndecan-like domain. Syndecans are heparan sulfate proteoglycans that are known to mediate interactions with extracellular matrix proteins and heparin-binding growth factors. Preliminary data support the putative interaction of rmS5D-SRCRB-HA with some extracellular matrix proteins, such as laminin and, to a lesser extent, fibronectin, but not collagen I or IV. Moreover, we also provide

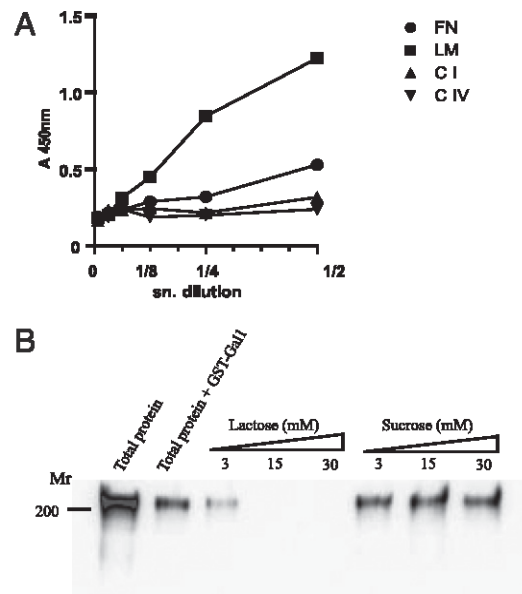


FIGURE 8. Interaction of rmS5D-SRCRB-HA with endogenous extracellular proteins. **A**, Binding of S5D-SRCRB to extracellular matrix proteins. Serial 2-fold dilutions of serum-free rmS5D-SRCRB-HA supernatants were added to 96-well ELISA plates coated with the indicated purified extracellular matrix proteins and left overnight at 4°C. Bound rmS5D-SRCRB-HA was detected using the 4D11.A2.H4 hybridoma supernatant plus a goat anti-rat IgG/HRP antiserum (Sigma). Plates were developed by adding TMB substrate (Sigma), and the absorbance was measured at 450 nm. The assay was repeated twice with similar results. FN, fibronectin; LM, laminin; C I, collagen I; C IV, collagen IV. **B**, Sugar-dependent binding of S5D-SRCRB to galectin-1. GST-Gal1 Sepharose beads (GST-Gal1) were incubated overnight at 4°C with a fixed amount (25 µl) of serum-free rmS5D-SRCRB-HA supernatants (total protein) in the presence or absence of increasing concentrations (3, 15, and 30 mM) of competing (lactose) or noncompeting (sucrose) sugars. Bound proteins were eluted with Laemmli's sample buffer and separated on 6% SDS-PAGE under reducing conditions for further Western blot analysis with 1H11.A8.G2 mAb plus HRP-labeled anti-rat IgG. Chemiluminescence results are presented.

evidence on the carbohydrate-dependent interaction of mS5D-SRCRB-HA with galectin-1, a host soluble lectin that functions as a damage-associated molecular pattern and a receptor for PAMPs (35). The mucosal-defense properties of mouse S5D-SRCRB against living organisms are supported by its broad binding and aggregating microbial spectrum that includes saprophytic and pathogenic bacteria and fungi; potential interactions with viruses remain to be studied. Our preliminary data indicated that this defensive role is played in the absence of detectable intrinsic bactericidal activity, which is not unusual for innate-immunity proteins; SAG is a well-known example of a non-bactericidal protein with defensive properties. By binding to microbial components, mouse S5D-SRCR seems to downregulate subsequent PAMP-induced cytokine release, as deduced from our experiments showing dose-dependent inhibition of IL-8 release following PGN stimulation of HEK 293 TLR2 transfectants. We consider that this could be important for preserving the integrity and the function of epithelia from excessive or prolonged inflammation caused by PAMPs in those tissues where S5D-SRCRB is expressed. This is best exemplified by the expression of mouse S5D-SRCRB in seminiferous testicular tubules, where infection and inflammation may cause male infertility, thus compromising murine reproductive capability (36). The expression of mouse S5D-SRCRB in these tissues also argues in favor of its putative

role in cell-differentiation processes. Interestingly, preliminary data from our group indicate that expression of mouse S5D-SRCRB is regulated during embryo development. More precisely, *in situ* RNA hybridization results at day 9.5 postcoitum showed that S5D-SRCRB is selectively detected in placodes, embryonic ectodermal thickenings where organs or structures will develop (37). Moreover, RT-qPCR data indicate that there is an important relative increase in its RNA expression from days 9–14 postcoitum, the meaning of which remains to be explored further. Finally, the relative preferential expression of mouse S5D-SRCRB observed in adult testis also opens the possibility that it may behave as a nonchromosome X-encoded cancer/testis Ag (38). Therefore, a systematic investigation of mouse S5D-SRCRB expression in human and mouse tumors should be performed to exclude this possibility.

The very limited information available on human SSc5D highlights the need for future studies to explore whether the functional and structural characteristics reported in this article for mouse S5D-SRCRB also apply to its human homolog. At present, marked differences exist regarding their tissue-expression pattern. Although the highest expression level of SSc5D is reported in placenta, spleen, colon, and lung, mouse S5D-SRCRB is mainly expressed in testis, kidney, and the serosal region of salivary and pancreas glands. To further clarify this point, parallel IHC analyses of mouse and human tissues performed with the 1H11.A8.G2 mAb, which shows human–mouse species cross-reactivity (U. Holmskov, unpublished observations), are urgently needed. The demonstration of conserved binding capabilities to a broad spectrum of pathogens, as well as to endogenous proteins, by the human protein homolog also requires further investigation.

In summary, to our knowledge, the molecular and functional characteristics of a new mouse group B SRCR-SF member, S5D-SRCRB, have been reported in this article for the first time. Apart from its likely involvement in protection against pathogenic or saprophytic microorganisms of the restricted epithelial surfaces where mouse S5D-SRCRB is expressed, other functions related to epithelial cell differentiation and homeostasis should be taken into consideration in future studies.

Acknowledgments

We thank the Department of Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, and the Cell Biology Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, for providing bacterial and fungal specimens. We also thank R. Fenutría, B. Suárez, M. Antón, C. Astasio, J. Milà, and M. Bayo for technical and administrative support.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927–930.
- Palm, N. W., and R. Medzhitov. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227: 221–233.
- Resnick, D., A. Pearson, and M. Krieger. 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 19: 5–8.
- Aruffo, A., M. A. Bowen, D. D. Patel, B. F. Haynes, G. C. Starling, J. A. Gebe, and J. Bajorath. 1997. CD6 ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol. Today* 18: 498–504.
- Sarrias, M. R., J. Grönlund, O. Padilla, J. Madsen, U. Holmskov, and F. Lozano. 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 24: 1–37.
- Wheeler, G. L., D. Miranda-Saavedra, and G. J. Barton. 2008. Genome analysis of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* indicates an ancient evolutionary origin for key pattern recognition and cell-signaling protein families. *Genetics* 179: 193–197.
- Freeman, M., J. Ashkenas, D. J. Rees, D. M. Kingsley, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and M. Krieger. 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8810–8814.
- Timmerman, L. A., N. A. Chipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop, and G. R. Crabtree. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383: 837–840.
- Hohenester, E., T. Sasaki, and R. Timpl. 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat. Struct. Biol.* 6: 228–232.
- Somoza, J. R., J. D. Ho, C. Luong, M. Ghate, P. A. Sprengeler, K. Mortara, W. D. Shrader, D. Sperandio, H. Chan, M. E. McGrath, and B. A. Katz. 2003. The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serine protease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure* 11: 1123–1131.
- Rodamilans, B., I. G. Muñoz, E. Bragado-Nilsson, M. R. Sarrias, O. Padilla, F. J. Blanco, F. Lozano, and G. Montoya. 2007. Crystal structure of the third extracellular domain of CD5 reveals the fold of a group B scavenger cysteine-rich receptor domain. *J. Biol. Chem.* 282: 12669–12677.
- Ojala, J. R., T. Pikkarainen, A. Tuuttila, T. Sandalova, and K. Tryggvason. 2007. Crystal structure of the cysteine-rich domain of scavenger receptor MARCO reveals the presence of a basic and an acidic cluster that both contribute to ligand recognition. *J. Biol. Chem.* 282: 16654–16666.
- Garza-García, A., D. Esposito, W. Rieping, R. Harris, C. Briggs, M. H. Brown, and P. C. Driscoll. 2008. Three-dimensional solution structure and conformational plasticity of the N-terminal scavenger receptor cysteine-rich domain of human CD5. *J. Mol. Biol.* 378: 129–144.
- Madsen, M., H. J. Møller, M. J. Nielsen, C. Jacobsen, J. H. Graversen, T. van den Berg, and S. K. Moestrup. 2004. Molecular characterization of the haptoglobin, hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J. Biol. Chem.* 279: 51561–51567.
- Brännström, A., M. Sankala, K. Tryggvason, and T. Pikkarainen. 2002. Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1462–1469.
- Bikker, F. J., A. J. Ligtenberg, C. End, M. Renner, S. Blaich, S. Lyer, R. Wittig, W. van't Hof, E. C. Veerman, K. Nazmi, et al. 2004. Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J. Biol. Chem.* 279: 47699–47703.
- Sarrias, M. R., S. Roselló, F. Sánchez-Barbero, J. M. Sierra, J. Vila, J. Yélamos, J. Vives, C. Casals, and F. Lozano. 2005. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J. Biol. Chem.* 280: 35391–35398.
- Sarrias, M. R., M. Farnós, R. Mota, F. Sánchez-Barbero, A. Ibáñez, I. Gimferrer, J. Vera, R. Fenutría, C. Casals, J. Yélamos, and F. Lozano. 2007. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 11724–11729.
- Vera, J., R. Fenutría, O. Cañadas, M. Figueras, R. Mota, M. R. Sarrias, D. L. Williams, C. Casals, J. Yélamos, and F. Lozano. 2009. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1506–1511.
- Fabrick, B. O., R. van Bruggen, D. M. Deng, A. J. Ligtenberg, K. Nazmi, K. Schornagel, R. P. Vloet, C. D. Dijkstra, and T. K. van den Berg. 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113: 887–892.
- Kisielow, J., M. Kopf, and K. Karjalainen. 2008. SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gamma delta T cells. *J. Immunol.* 181: 1710–1716.
- Gonçalves, C. M., M. A. Castro, T. Henriques, M. I. Oliveira, H. C. Pinheiro, C. Oliveira, V. B. Sreenu, E. J. Evans, S. J. Davis, A. Moreira, and A. M. Carmo. 2009. Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Mol. Immunol.* 46: 2585–2596.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497.
- Padilla, O. 2003. Doctoral dissertation, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Woodward, H. D., N. J. Ringler, R. Selvakumar, I. M. Simet, V. P. Bhavanandan, and E. A. Davidson. 1987. Deglycosylation studies on tracheal mucin glycoproteins. *Biochemistry* 26: 5315–5322.
- Müller, S., S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, and F. G. Hanisch. 1997. Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 272: 24780–24793.
- Madsen, J., J. Mollenhauer, and U. Holmskov. Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun.* 16: 160–167.
- Camby, I., M. Le Mercier, F. Lefranc, and R. Kiss. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R–157R.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer. 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* 3: 118–120.
- Kagnoff, M. F., and L. Eckmann. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* 100: 6–10.
- Svanborg, C., M. Hedlund, H. Connell, W. Agace, R. D. Duan, A. Nilsson, and B. Wullt. 1996. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 797: 177–190.
- Godaly, G., G. Bergsten, L. Hang, H. Fischer, B. Fréndéus, A. C. Lundstedt, M. Samuelsson, P. Samuelsson, and C. Svanborg. 2001. Neutrophil recruitment, chemokine receptors, and resistance to mucosal infection. *J. Leukoc. Biol.* 69: 899–906.
- Hertz, C. J., and R. L. Modlin. 2003. Role of toll-like receptors in response to bacterial infection. *Contrib. Microbiol.* 10: 149–163.

2354

CHARACTERIZATION OF MOUSE S5D-SRCRB

34. Ligtenberg, A. J., E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen, and J. Mollenhauer. 2007. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *Biol. Chem.* 388: 1275–1289.
35. Sato, S., C. St-Pierre, P. Bhaumik, and J. Niemien. 2009. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol. Rev.* 230: 172–187.
36. Bhushan, S., H. C. Schuppe, S. Tchatalbachev, M. Fijak, W. Weidner, T. Chakraborty, and A. Meinhardt. 2009. Testicular innate immune defense against bacteria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306: 37–44.
37. Begbie, J., and A. Graham. 2001. The ectodermal placodes: a dysfunctional family. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356: 1655–1660.
38. Simpson, A. J., O. L. Caballero, A. Jungbluth, Y. T. Chen, and L. J. Old. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5: 615–625.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary FIGURE 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of mouse *s5d-srcrb*. The putative signal peptide is *double underlined*. SRCR domains are *single underlined* and the sequence with homology to syndecan domain is *dash underlined*. Nucleotides at the exon-intron boundaries are highlighted in *bold italics*. The putative N-glycosylation sites and the stop codon are marked with a circle and an asterisk, respectively.

Supplementary FIGURE 2. RT-qPCR analysis of *s5d-srcrb* expression in normal and leukemic cells. TRIzol total RNA preparations from the indicated mouse cells and tissues were retrotranscribed into cDNA using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). The primers and cycling conditions used for amplification of *18S* and *s5d-srcrb* genes were the same as those used in Fig. 3 and reported in the Materials and Methods section. Gene expression was normalized to housekeeping gene *18S* and expressed in arbitrary units. BMDMo resting, unstimulated bone marrow-derived monocytes (>95% CD11+); BMDMo LPS(+), BMDMo activated for 6 hs with 1ng/ml LPS. HEK 293 transfectants, HEK 293-EBNA cells stably expressing rmS5D-SRCRB-HA.

Supplementary FIGURE 3. Developmental expression of the *s5d-srcrb* transcript. Mouse embryos were obtained from CD1 mice matings and collected at 9.5 dpc. Whole-mount in situ hybridization was performed essentially as described*, using digoxigenin-labelled riboprobes. Digoxigenin was detected with NBT/BCIP (Roche) which gives a purple staining. After staining, embryos were fixed in 4% PFA,

cryoprotected in 15% sucrose and embedded in 7.5% gelatine/15% sucrose. Blocks were frozen in 2-Methylbutane (Sigma) to improve tissue preservation, then sectioned at 20 μm thickness on a *Leica* CM 1510-1 cryostat. Whole mount embryos and sections were imaged under a fluorescence microscope *Leica* DM6000B. Whole-mount *in situ* hybridization of 9.5 dpc embryos with *s5d-srcrb* antisense (a-d) and sense (e-h) probe. To generate both probes, cDNA was synthesized from total RNA amplified using primers msd1.FW and msd2.Rv cDNA was then cloned in a pFLCI vector (Qiagen). To obtain the antisense probe, the plasmid was linearized with *Sa*II (Roche) and transcribed with T3-RNAPolimerase (Roche). Similarly, for the sense probe linearization was carried out with *Sst*II (Roche) and transcription was performed with T7-RNAPolimerase. Note that specific RNA staining with antisense probe revealed *s5d-srcrb* expression in the anterior and lateral aspects of the otic vesicle and in the olfactory placode. nt, neural tube; ov, otic vesicle; olp, olfactory placode.

* Wilkinson, D.G., Nieto, M.A., 1993. Detection of Messenger-Rna by in-Situ Hybridization to Tissue-Sections and Whole Mounts. In *Guide to Techniques in Mouse Development*. 225. p. 361-373.

Supplementary FIGURE 4. RT-qPCR analysis of *s5d-srcrb* expression at embryo developmental stages. RNA preparations were obtained from eight different embryos of C57BL/6J mouse at 9 dpc (a, b, c and d) and 14 dpc (A, B, C and D) using TRIzol (Invitrogen). cDNA synthesis was carried out using the GeneAmp PCR kit (Roche). The primers and cycling conditions used for amplification of *18S* and *s5d-srcrb* genes were the same as those used in Fig. 3 and reported in the Material and Methods section. Gene expression was normalized to housekeeping gene *18S* and expressed in arbitrary units.

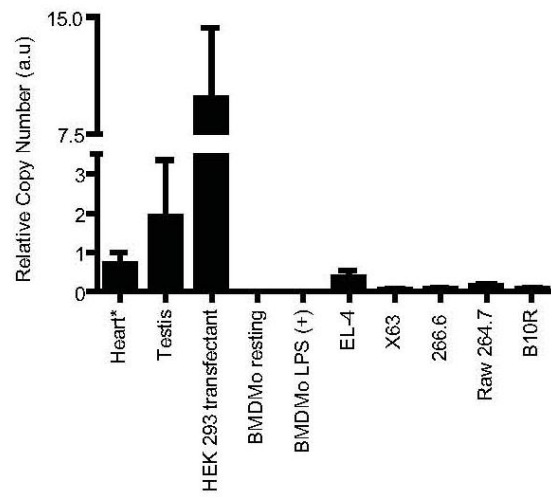
```

.....
cccaacaatactacccttccctcaaccctgcaaccctcaacagatccctccatccctccgaagaacagaaacttccctcccaactaaagcctagactaaactcagagttgacctttgag 3712
F T N T R P S S T P A T P T S S L P S S R K T E L S S P T K P R L N S S L T F S 1200
.....
gaagcccatccacagacgcctccagagcagaacctagagctctttctagcctggagtcggccctccagtcctccagcctccaaacttggaccactccacacagatgcttcc 3832
S A P S T D A S Q T Q N L E L F L A S S S G P S S P S P A S N L O P L P T O A P 1240
.....
aaaccaccagagccagaccttacactcagctcagaccacctcaactcaagggcccaaccctcaatacaaccagatccttltggccatgtgtgtcccccattaccaccagtaaggtc 3952
K P P R S Q T L H S A S D H L T Q G P T P N H N P D P F G E C V S P L P P V R V 1280
.....
atggcttgtgagccactgccttgggtgagctggttaggtgctgtgagggaggtgggtgacagctgcagagactgacctgggtccctggagcaggacccggcaggagcccaagtocttggca 4072
M A C E P P A L V E L V G A V R E V G D Q L Q R L T M V L E Q D R Q E R Q V L A 1320
.....
ctggccctagccagttggtagaggtgctcaggggttggggcagctgagtgagactgtaaaagagcctagcagaggtggcctggccccccagcactcctgtgccatgaccocaccaca 4192
L G L A Q L V E A A Q G L G Q L S E T V K R L A B V A M P P S T P V P M T T T T 1360
.....
gaggaggagagagcctctgaggggagatgttgaccacctctgaatccacggtgcttaagatactc 4261
B E E E R P L R G D V * 1371

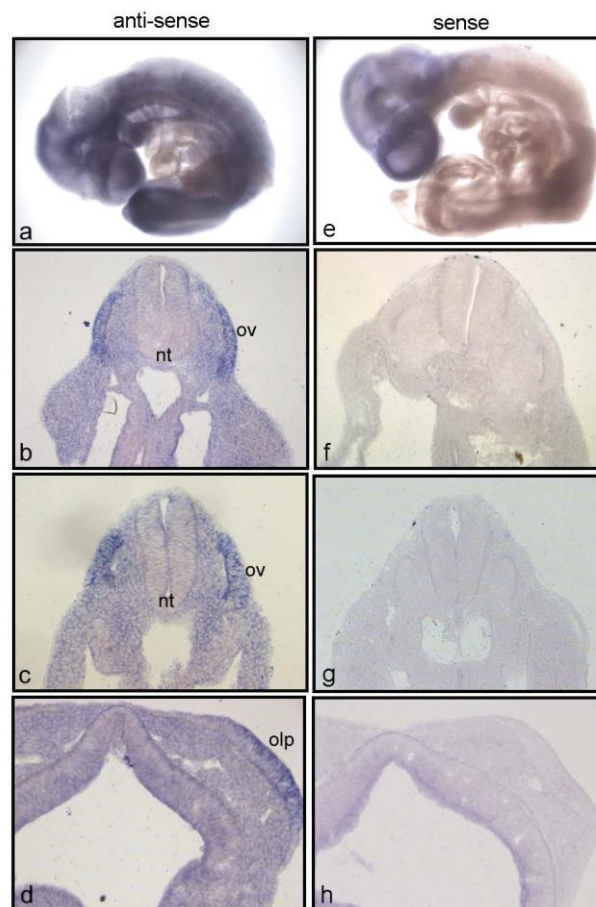
```

the number of colonies counted in duplicate after overnight incubation at 37°C. Two independent experiments were performed, with similar results; a representative out of the two is shown here.

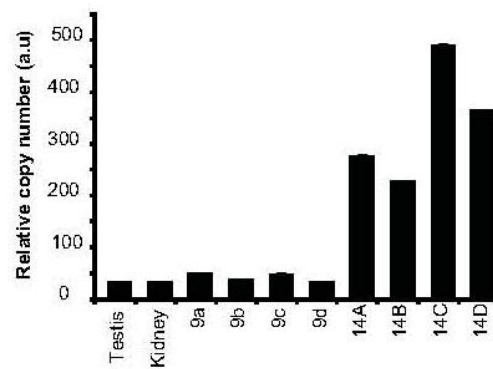
Supplementary Figure 2



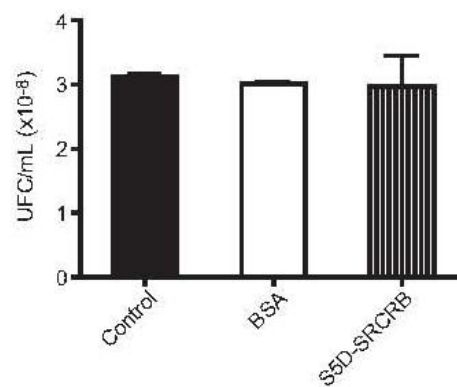
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Table I. Source of EST clones with the highest E-value for *s5d-srcrb*.

EST	Tissue source	Size (nt)	E value
gb BU704083.1	Whole brain: 12.5dpc	1355	0.0
gb BU522633.1	Colon	1220	0.0
gb AI430129.1	E13.5-14.5dpc total fetus	1142	0.0
gb BU756713.1	Trophoblast	1040	0.0
emb CR756934.1	muscle	1031	0.0
gb BQ832084.1	Fetal liver	1027	0.0
emb CR757678.1	Muscle	1023	0.0
gb BQ287699.1	E10.5, E12.5, E16.5, newborn, adult, mixed	1014	0.0
emb CR756931.1	Muscle	942	0.0
gb BU056602.1	Whole brain of E12.5dpc	922	0.0
gb W67038.1	E13.5-14.5dpc total fetus	865	0.0
gb CX208189.1	Lateral wall of lateral ventricle	787	0.0
gb AI845825.1	Pineal gland	751	0.0
gb AI604846.1	E13.5-14.5 dpc total fetus	738	0.0
gb BE652808.1	Pineal gland	722	0.0
gb W42249.1	E19.5 dpc total fetus	679	0.0
emb CR757674.1	Muscle	666	0.0

dpc, days post-conception; E, embryo; EST, expressed-sequence tag;

Supplementary Table II: Reactivity of rat mAbs against recombinant and endogenous mouse *S5D-SRCRB* protein.

Hybridoma	Recombinant			Tissue-expressed		
	IP	ELISA	WB	IP	WB	IHC
1H11.A8.G2	+	+	+	-	+	+
5E12.G3.B1	+	+	+	-	+	-
7G4.E1.H7	+	+	+	-	+	-
8F4.F3.F9	+	+	+	-	+	-
4D11.A2.H4	+	+	+	-	+	+
5B7.B8.A1	+	+	+	-	+	-
8C4.D6.C9	+	+	+	-	+	-

The recombinant protein comes from serum-free supernatants of HEK293-EBNA transfectants expressing a C-terminal HA-tagged mouse *S5D-SRCRB* protein. The tissue expressed protein comes from RIPA buffer solubilizates of mouse testis. IP, Immunoprecipitation. WB, Western blot. IHC, Immunohistochemistry.

Capítol II

Expression of S5D-SRCRB in the urogenital tract

Cristina Miró-Julià¹, Cristina Escoda-Ferran¹, Esther Carrasco¹, Jesper Bonet², Dorte R. Fink², Xiabo Gao³, Neal Paraguas³, Juan Oliver³, Qais Al-Awqati³, Uffe Holmskov², Francisco Lozano^{1,4,5}.

¹Grup d'Immunoreceptors, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centre Esther Koplowitz, Barcelona, Spain. ²Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark. ³Departments of Medicine and Physiology and Cellular Biophysics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA. ⁴Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Resum. S5D-SRCRB és una glicoproteïna murina de secreció recentment reportada que pertany a l'antiga i altament conservada superfamília de receptors proteïcs SRCR, dels quals es té escassa informació funcional. Les dades disponibles indiquen que S5D-SRCRB presenta un patró d'expressió tissular restringit i que interactua amb components conservats de la paret bacteriana i fúngica, així com amb proteïnes de l'ECM. Partint de la seva expressió preferencial en testicle i ronyó, es va realitzar un anàlisi immunohistoquímic detallat de l'expressió de S5D-SRCRB al llarg del tracte urogenital per tal de comprendre millor el seu rol biològic. Mitjançant tincions per S5D-SRCRB es va observar que aquesta proteïna es trobava en algunes estructures específiques del testicle, la bufeta urinària, els urèters i ronyó de ratolins. Estudis de doble marcatge van mostrar que S5D-SRCRB col·localitza amb galectina-3 (Gal-3) a la bufeta urinària i als urèters. Aquests resultats concorden amb d'altres, obtinguts per estudis bioquímics, que mostren l'existència d'una interacció entre Gal-3 i S5D-SRCRB dependent d'hidrats de carboni. En els ronyons, S5D-SRCRB marca selectivament la papil·la, just per sota les cèl·lules mare renals, i també les cèl·lules principals (P) i algunes cèl·lules intercalades (IC) dels conductes col·lectors (CD). Mitjançant l'ús d'un model cel·lular de diferenciació d'IC, es va observar que S5D-SRCRB s'expressava preferentment en IC diferenciades terminals. Aquest patró d'expressió, però, s'inverteix quan les cèl·lules són exposades a peptidoglicà (PGN) bacterià. Els ronyons de ratolins sotmesos a una infecció del tracte urinari (UTI) durant 24 hores també van mostrar una expressió del ARNm de S5D-SRCRB lleugerament augmentada. En conjunt, els resultats indiquen que

S5D-SRCRB és un component integral del tracte urogenital, l'expressió del qual és modulada durant la infecció i durant processos de diferenciació cel·lular.

Abstract

S5D-SRCRB is a new mouse secretory glycoprotein belonging to the ancient and highly conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily of protein receptors for which little functional information exists. Available data indicate that S5D-SRCRB presents a restricted tissue expression pattern and interacts with conserved bacterial and fungal cell wall components, as well as with some endogenous extracellular matrix proteins. Based on its preferential expression in testis and kidney, a detailed immunohistochemical analysis of S5D-SRCRB expression along the urogenital tract was performed. Staining for S5D-SRCRB was observed only in certain specific structures of mouse testis, urinary bladder, ureter and kidney. In kidneys, S5D-SRCRB was selectively expressed in papilla just underneath of stemness cells, as well as in principal and some intercalated cells (IC) of collecting ducts. Double staining studies showed that S5D-SRCRB co-localizes with Galectin 3 in kidney collecting ducts, urinary bladder and ureters, but not testis seminiferous tubules, which is in agreement with biochemical studies demonstrating the carbohydrate-dependent interaction of Gal-3 and S5D-SRCRB. By using a rabbit cell model of IC differentiation, preferential expression of S5D-SRCRB was observed in terminally differentiated IC, although this expression pattern was reversed after exposure to bacterial peptidoglycan. Kidneys from mice subjected to an experimental 24h Urinary Tract Infection also showed slightly up-regulated mRNA expression for S5D-SRCRB. Taken together, the results indicate that S5D-SRCRB is an integral component of the urogenital tract the expression of which is modulated during infection and cell differentiation events.

Introduction

S5D-SRCRB/SSc5d is a recently reported secreted glycoprotein belonging to the scavenger receptor cysteine-rich super family (SRCR-SF) (Miro-Julia, Rosello et al. 2011) (Goncalves, Castro et al. 2009), which is an ancient and highly conserved group of soluble or/and membrane bound proteins of the innate and

adaptive immune system (Sarrias, Gronlund et al. 2004). Although there is no unifying function for SRCR-SF members, all of them members are characterized by the presence of one or more SRCR repeats, which are 90-110 a.a long cysteine-rich domains with a well-defined structure involving an α -helix and six antiparallel β -sheets (Hohenester, Sasaki et al. 1999). There are two types of SRCR domain named A and B, depending on the number of cysteines and the exons encoding the domain. S5D-SRCRB contains 5 SRCR type B domains, which are interspaced by PST-rich polypeptides, as well as protein modules of yet undefined structure, where most O- and N-glycosylation sites are located.

Immunohistochemical and mRNA analyses reveal that mouse and human S5D-SRCRB present a restricted tissue expression pattern. Mouse S5D-SRCRB is mainly expressed in the digestive and the urogenital tracts, with testis, kidney, pancreas and lymphoid organs, those with a higher expression levels (Miro-Julia, Rosello et al. 2011). In contrast, the human homologue (SSc5d) was reported to be mainly expressed in placenta, with lung, colon and spleen showing lower mRNA levels (Goncalves, Castro et al. 2009).

From the functional point of view little information is available for mouse S5D-SRCRB, while its human homologue SSc5d has been studied further. It has been reported that S5D-SRCRB is involved in recognition of pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) present in Gram positive (peptidoglycan) and Gram negative (lipopolysaccharide) bacteria and fungi (β -glucan and zymosan), as well as in the agglutination of these microorganisms. This PAMP-binding property is shared by a selected group of SRCR-SF members, some of them presenting with a structural bacterial binding motif (VELVxxxW), which is also present in S5D-SRCRB. Additionally, it has also been reported that S5D-SRCRB interacts with endogenous extracellular proteins such as Galectin 1 and the extracellular matrix proteins (ECM) Laminin and Fibronectin. Based on these data it can be hypothesized that S5D-SRCRB plays a role in the innate defense and homeostasis of some mucosal surfaces.

S5D-SRCRB's putative role recalls that reported for human DMBT1 (for Deleted

in malignant brain tumors 1), and also called Glycoprotein-340 (gp-340) (Holmskov, Mollenhauer et al. 1999) and Salivary Agglutinine (SAG) (Ligtenberg, Bikker et al. 2001), which is the paradigmatic member of group B SRCR-SF proteins. DMBT1 has several protein homologues in different species (CRP-ductin in mouse; Ebnerin in rat; Hensin in rabbit; Bovine Gallbladder Mucin in cow and H3 in monkey) (Sarrias, Gronlund et al. 2004) with similar molecular and functional characteristics. DMBT1 and their homologues are actually broadly expressed in digestive, respiratory and genitourinary epithelial tracts. DMBT1 also functions as a pattern recognition receptor (PRR) able to interact with and/or induce the aggregation of several Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi and virus (Influenza A Virus and HIV-1) (Madsen, Mollenhauer et al. 2010). Additionally, DMBT1 binds to endogenous proteins such as Surfactant Protein A and D (SP-A, SP-D), Galectin 3 and ECM proteins. Firstly characterized as a tumor suppressor gene (Mollenhauer, Wiemann et al. 1997), DMBT1 is also known to drive the terminal differentiation of some cell types in intestine and kidney (Kang, Nielsen et al. 2005) (Vijayakumar, Takito et al. 2006) (Al-Awqati, Vijayakumar et al. 1999). The latter is exemplified by the role of Hensin (a rabbit homologue of DMBT1) in the repolarization of the intercalated cells (IC) at the cortical collecting ducts (CCD).

In the present report, an immunohistochemical analysis of S5D-SRCRB expression along the urogenital tract has been performed in order to further understand its role in epithelial homeostasis and differentiation. The results indicate that this protein is expressed both in highly specialized cell types where differentiation phenomena take place (e.g. collecting ducts or seminiferous tubules) as well as in other less specialized epithelial cells (e.g. urinary bladder and urethra) where a more protective barrier function is undergoing. This, together with subtle expression changes under microbial aggression circumstances, supports a dual role for S5D-SRCRB in innate defence and differentiation of certain urogenital epithelial surfaces.

Material & methods

Mouse husbandry

C57BL/6 and BALB/c mice were handled according to approved protocols by Columbia IACUC and the UB.

Tissue-expression analysis of S5D-SRCRB

For immunohistochemical assays, four-micrometer sections from neutral-buffered formaldehyde-fixed paraffin-embedded C57BL/6J mouse tissue blocks were mounted on ChemMate Capillary Gap Slides (Dako, Glostrup, Denmark), dried at 60°C, deparaffinized, and hydrated. Prior to antigen retrieval, blocking of endogenous peroxidase was performed in 1.5% hydrogen peroxide in TBS (Tris-Buffered Saline buffer (pH 7.4) for 10 min. Antigen retrieval was carried out using microwave heating in target retrieval solution (Dako) or pepsin. Tissue-Tek containers (Miles, Elkhart, IN), each with 24 slides in 250 ml buffer, were placed on the edge of a turntable inside the microwave oven. Slides were heated for 11 min at 900 W and then for 15 min at 400W. After heating, slides were left in buffer for 15 min. Incubation with 1:10 diluted (in Ab Diluent S2022; Dako) serum-free culture supernatant from rat anti-S5D-SRCRB hybridomas (1H11.A8.G2 or 4D11.A2.H4) (Miró-Julià C *et al.*, 2011) was carried out for 60 min at room temperature (RT). No immunostaining was seen when the primary antibody was omitted or substituted with an isotype control. Immunostaining was automated using the PowerVision+ HRP detection system DPVB+500HRP (ImmunoVision Technologies, Brisbane, CA) on the TechMate 500 instrument (Dako). DAB+ (K3468; Dako) was used as substrate-chromogen system. Brief nuclear counterstaining in Mayer's hematoxylin followed immunostaining. Finally, cover slips were mounted with AquaTex (Merck, Darmstadt, Germany).

For immunofluorescence (IF) staining, C57BL/6J mice were anesthetized with i.p. ketamine (100 mg/kg) and perfused through the left ventricle first with PBS (0.09% NaCl in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4), followed by 4%

paraformaldehyde (PFA) in PBS. This procedure highly preserved the histology of kidneys, a tissue highly vascularized tissue. Then, tissues of interest were removed, spliced in two halves and further fixed by immersion in 4% PFA for 4 h at RT and further overnight (o/n) at 4°C. Following extensive rinsing with PBS, tissues were cryoprotected by o/n immersion at 4°C in PBS containing 0.9 M (30%) sucrose, and mounted for cryosectioning in Tissue-Tek (Sakura) before freezing in liquid nitrogen and sectioning at 5 μ m with a Leica CM3050 cryostat (Belair Instrument Company). Tissue sections were picked up on Fisher Superfrost Plus charged glass slides (Fisher Scientific), blocked with 4% fetal calf serum (FCS) in PBS for 30 min, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: 4.5 μ g/mL affinity-purified rat anti-S5D-SRCRB (1H11.A8.G2 or 4D11.A2.H4) monoclonal antibodies (mAb); a 1:100 dilution rabbit anti-V-ATPase B1/2 (sc-20943; Santa Cruz) and anti-AQP2 (A7310; Sigma) polyclonal antiserum; a 1:50 dilution rabbit anti- α 6 Integrin (sc-10730; Santa Cruz) and goat anti-Cytokeratin5 (sc-17090; Santa Cruz) polyclonal antiserum. Then, PBS washed sections were incubated for 1h at RT with secondary antibodies: a 1:1000 dilution AlexaFluor647-labeled anti-goat IgG (A21447; Invitrogen); 1:100–1:200 dilution Texas Red-, Rhodamine- or Fluorescein-labeled donkey anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Nuclei staining was carried out with DAPI at a 1:1000 dilution (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride; Life Technologies) in PBS. For Galectin 3 co-localization studies, following S5D-SRCRB staining (see above) tissue sections were extensively washed and sequentially incubated for 1h at RT with 1:100 dilution biotin-labeled rat anti-mouse/human MAC-2 (Gal-3) mAb (CL8942B; Cedarlane) and a 1:1000 dilution Alexa555-labeled streptavidin; nuclei were counterstained with DAPI. Digital images were acquired with Nikon MICROPHOT- SA EPI-FL3 fluorescence microscope (Nikon Instruments) with a SPOT-RT 941 SE digital camera (Diagnostic Instruments).

In vitro clone C cell line analyses

Clone C derive from rabbit kidney cortex β -intercalated cells isolated on the basis of their apical binding to peanut lectin and immortalized by transfection

with pZipSVtsA58, a plasmid that contains the temperature-sensitive SV40 large T-antigen (Edwards 1992). Clone C cells were maintained at 32 °C in 150-cm² flasks (Costar Corp.) in 50:50 DMEM and Ham's F-12 medium with L-Glutamine (cat. # 10-090; Mediatech-cellgro), 10% FCS (Gibco), 1x Insulin-Transferrin-Selenium (ITS; cat. # BW17-838Z, ITS x500; LONZA) and 20µg/mL hydrocortisone (cat #. H0396; Sigma), and passed 1:6 every week as described (Edwards 1992). For experiments, the cells were trypsinized and passed onto Costar 0.45-µm polycarbonate filters at a density of 4·10⁴ cells/cm² (low density, LD), or 4·10⁵ cells/cm² (high density, HD) in FCS-deprived medium, and transferred to 40 °C to inactivate the T antigen. Growing the cells for 1–2 weeks at 40°C on Transwell filters permits them to express two polarized phenotypes depending on seeding density (LD resembling β-IC, and HD resembling α-IC). In some experiments, LD and HD clone C cells cultured on transwell filters were apically exposed to 20µg/mL of peptidoglycan (PGN) (cat. # 77140; Sigma) for 24h, before staining for extracellular S5D-SRCRB expression.

For intracellular IF studies, LD and HD cultures on transwell filters were fixed for 10 min at RT in 4% paraformaldehyde, blocked and permeabilized for 1 h at RT in PBS plus 3% BSA and 0.075% saponin, pH 7.4. Transwell filters were then sequentially incubated for 1–2 h at RT with 4.5 µg/mL affinity-purified rat anti-S5D-SRCRB (4D11.A2.H4) and rhodamine-labeled donkey anti-rat IgG antiserum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) in PBS/BSA/saponin. Nuclei staining was carried out with a 1:1000 dilution TO-PRO[®]-3 Iodide (cat #. T3605; Life technologies) in PBS. Stained monolayers were mounted on glass slides with 90% glycerol and 0.1% phenylene diamine in PBS and viewed on a LSM 510 META confocal microscopy system (Carl Zeiss MicroImaging) using LSM image browser software. For extracellular IF analyses, the filters were first extensively washed with PBS, and then incubated o/n at 4 °C with 4.5 µg/mL affinity-purified rat anti-S5D-SRCRB antibody (4D11.A2.H4 or 1H11.A8.G2) in PBS alone. The filters were washed with PBS and incubated for 1 h at RT with the same secondary antibody as mentioned above, washed, and fixed for 0.5–1

min with ice-cold methanol. Nuclear staining was carried out with TO-PRO[®]-3 Iodide, washed extensively with PBS, and mounted and analyzed with confocal microscopy as described before.

Galectin 3 and S5D-SRCRB interaction assays

Bacterial expression of GST, GST-Gal1 and GST-Gal-3 fusion proteins, as well as of wild-type and mutant (R186S) rhGal-3, was carry out by transformation of the BL21 *E. coli* strain with the appropriate pGex plasmids kindly provided by Dr. L. Baum (UCLA, USA), Dr. Fu-Tong Liu (UC Davis, California, USA), and Dr. Leffler (Lund University, Sweden). For purification of GST fusion proteins, transformed bacterial colonies plated on LB-ampicillin were grown at 37°C with aeration in 500 ml 2YT broth plus 0.1mg/ml ampicillin. When the OD_{600nm} was reached 0.5-0.8, isopropylthio-β-galactoside (IPTG; 0.2mM) was added to the culture and induced overnight at 25°C. Then, cells were pelleted at 2500 rpm for 30 min at 4°C, and resuspended in 60mL of 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, 20mM β-ME, 10mM sucrose and 2.5mL protease inhibitor cocktail solution (Complete, Roche) for sonication (3 pulses of 12 s each). Following centrifugation at 14500 rpm for 90 min at 4°C, supernatants were incubated for 2h at 4°C under orbital rotation with *Glutathione sepharose*TM4B (GE Healthcare). Adsorbed beads were extensively washed first with 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM β-ME, 5 mM sucrose and protease inhibitor cocktail and then with 20 mM Tris HCl (pH 7.5). For purification of wild-type and mutant rsGal-3 proteins the same procedure was performed except that, following sonication, solubilizates were loaded over a Lacotsyl-Sepharose beads and the protein eluted by addition of PBS plus 0.25 M lactose and 10mM β-ME.

Pull-down assays were performed by incubating overnight at 4°C under orbital rotation GST-Gal3–Sepharose beads (10 μl of 50% (v/v) in blocking buffer (TBS plus 5% BSA) with serum-free culture supernatants from HEK293-EBNA transfectants expressing hemagglutinin (HA)-tagged recombinant S5D-SRCRB (Miro-Julia, Rosello et al. 2011), in the presence or absence of increasing concentrations (3, 15, 30 mM) of competing (lactose) or non-competing

(sucrose) sugars. Beads were washed sequentially with TBS 0.01% Tween 20 and TBS alone, and bound proteins were then eluted with Laemmli's sample buffer for further separation on SDS-PAGE under reducing conditions and Western blot analysis of S5D-SRCRB as previously reported (Miro-Julia, Rosello et al. 2011).

ELISA binding assays were performed by coating 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) overnight at 4°C with 1µg/well of purified rhGal-3 or rhGal-3-R186S proteins in PBS. Nonspecific binding to plastic was prevented by incubation for 1h at room temperature with blocking solution (PBS plus 3% BSA). Then, serum-free culture supernatants containing HA-S5D-SRCRB (see above) were added to the wells and incubated for 2h at room temperature. Following extensive washings with PBS 0.05% Tween-20, bound protein was detected by 1h incubation at room temperature with 90 ng/mL affinity-purified anti-S5D-SRCRB mAb (1H11.A8.G2) and a 1:5000 dilution HRP-conjugated anti-rat Ig (sigma), developed by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate (Sigma). The absorbance was measured at OD 450nm. The assay was repeated at least twice with similar results.

Mouse model of Urinary Tract Infection (UTI)

Experimental UTI was performed on BALB/c mice (n=5) following a previously reported method (Chia-Suei Hung et al, Nature Protocols 2009). Briefly, 5×10^7 colony forming units (CFUs) of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) were dispensed in a volume of 50 µl directly into the bladder, through the urethra. After 24h both kidneys were removed. One was used for determining bacterial load by plating tissue homogenate on suitable agar plates and further counting of bacterial CFUs. The other was used for total RNA extraction as described below.

Real-time retrotranscription quantitative PCR (RT-qPCR) assays

Analysis of *s5d-srcrb* expression from control and UTI kidneys from Balb/c mouse was performed by RT-qPCR assays from total RNA extracted using the

TRIzol reagent method, following manufacturer's instructions (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using the GeneAmp PCR kit (Roche). Briefly, 0.5–1 mg total RNA was mixed with 2.5 mM oligo-d(T)16 primer, 1 mM 29-deoxynucleoside 5'-triphosphates, PCR Buffer II, and 5 mM MgCl₂. After denaturation for 5 min at 65 °C, 20 U RNase inhibitor and 50 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase were added (20 µl final volume) and incubated for 90 min at 42 °C followed by inactivation at 99 °C for 15 min. cDNA integrity was checked by PCR using primers specific for the housekeeping GAPDH gene (GAPDHfw: 5' AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3' and GAPDHrv: 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3') and the s5d-srcrib gene (mS5D.Fw: 5'-AAGACGTGGTGCTCACCTGC-3' and mS5D.Rv: 5'-TCCCACGTCCAGGAAGACTC-3') using the following cycling conditions: 1 cycle of 2 min at 93°C, followed by 30 cycles of 93 °C for 45 s, 56 °C for 45 s, and 72 °C for 5 min. For RT-qPCR, the same s5d-srcrib and GAPDH gene-specific primers were used in a reaction mixture of 1µl cDNA (25ng/mL) and LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche Diagnostics). Reactions were carried out on an ABI 7900HTT FastReal Time PCR System (Applied Biosystems) under the following cycling conditions: 1 cycle of 10 min at 95 °C, and 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Gene expression was normalized to GAPDH and expressed in arbitrary units.

Results

Immunohistochemical analysis of S5D-SRCRB in the urogenital tract

The recent cloning and further characterization of mouse S5D-SRCR expression by real-time retrotranscription quantitative PCR (RT-qPCR) and immunohistochemical (IHC) analyses evidenced that this protein is preferentially expressed in testis and kidney (Miro-Julia, Rosello et al. 2011), two organs with a common embryological origin (intermediate mesoderm) (Kluth, Fiegel et al. 2011). Consequently, a more systematic and detailed IHC study of S5D-SRCRB expression along the urogenital tract was performed on wild-type mice (C57Bl/6J) by means of two previously reported rat monoclonal

antibodies (4D11.A2.H4 and 1H11.A8.G2) which are suitable for work on paraffin-embedded tissues (Miro-Julia, Rosello et al. 2011). Sections of mouse testis, epididymis, urethra, ureters and urinary bladder gave positive staining for S5D-SRCRB, limited to certain anatomical structures (Fig. 1). Indeed, S5D-SRCRB was found expressed at the luminal surface of epididymal tubules with strong staining of the intraluminal mucous material (Fig. 1E and 1F). At seminiferous tubules, S5D-SRCRB staining was neither observed at spermatogonia (outer layer) nor spermatids (most luminal layer), but to the region where primary and secondary spermatocytes are arranged. In kidney sections, only some tubules stained positive for S5D-SRCRB, which were sometimes located at the cortical region but were more frequently found in the outer medulla and papilla (Fig. 1I). Interestingly, strong positive staining was also detected in renal pelvis (Fig. 1L).

At ureters, urinary bladder and urethra, staining for S5D-SRCRB was observed at the topmost epithelial cell layer (Fig. 1C, 1D, 1G and 1H).

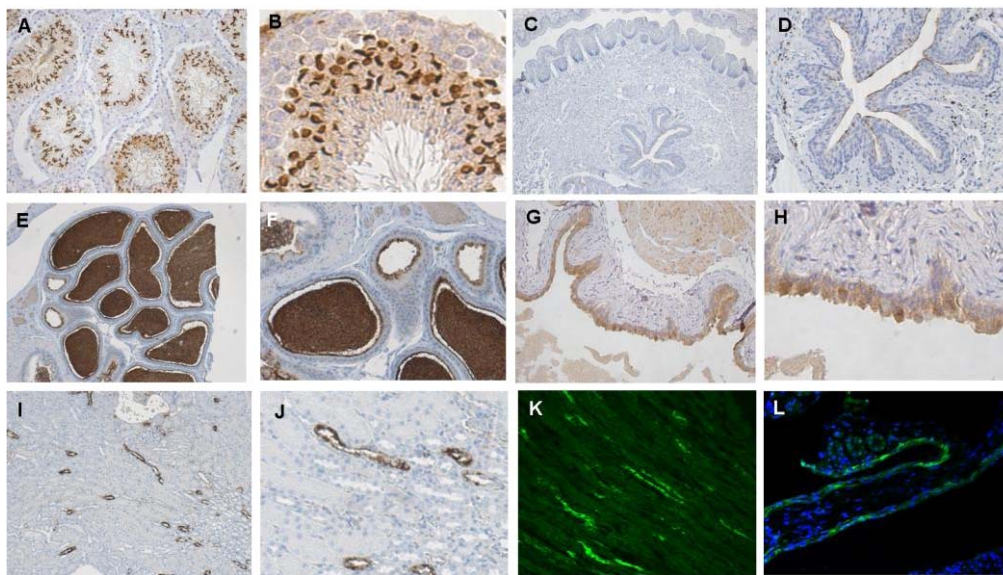


Figure 1. Tissue-expression analysis of mouse S5D-SRCRB. Immunohistochemical staining of paraffin-embedded (A-J) and 4% paraformaldehyde fixed (K and L) mouse tissue sections (A-B, testis; C-D, Urethra; E-F, epididymis; G-H, Urinary bladder; I-J, Kidney; K, papilla; L, renal pelvis) with rat 4D11.A2.H4 mAb (1:40 diluted culture supernatant, A-J; 2.5 μ g/mL affinity purified mAb, K and L). Development was carried out with HRP-conjugated (A-J) or FITC-conjugated (K and L) anti-rat Ig. Nuclei counterstaining was performed with Hematoxylin (A-J) and DAPI (K and L). Magnification $\times 10$ (A, C, E, G and I) or $\times 40$ (B, D, F, H, J, K and L).

Expression of S5D-SRCRB in renal collecting tubules

Better identification of the specific cell type/s responsible for the tissue expression pattern observed for S5D-SRCRB in kidney, was performed by double immunohistochemical stainings. First, keeping in mind that homing of stem cells of kidney takes place in a very specific area of the renal pelvis, a location where S5D-SRCRB staining concentrates, triple stainings with antibodies against the stem markers Cytokeratin 5 and $\alpha 6$ Integrin were performed in combination with the anti-S5D-SRCRB (1H11A8G2) mAb. As shown by figure 2A, S5D-SRCRB did not co-localize with any of the stem markers used, but it was expressed in close vicinity and juxtaposed to those stem cells. Since the kidney staining pattern observed for S5D-SRCRB was suggestive of its putative expression on collecting ducts (CD), another set of stainings were set up to explore the possible co-localization of S5D-SRCRB with markers of principal (P) and intercalated (IC) cells from CD, such as Aquaporin 2 (AQ2) and the B1 subunit of Vacuolar-type H^+ -ATPase (VB1 ATPase), respectively. These stainings showed that S5D-SRCRB clearly co-localized with AQ2, meaning that S5D-SRCRB is expressed in P cells of CD (Fig. 2.C). However, some AQ2-negative cells stained for S5D-SRCRB (Fig. 2D), suggesting that IC could also expressed S5D-SRCRB. On this regard, VB1 ATPase-positive cells showed only partial co-localization, suggesting that not all but only a certain subtype of IC cells would express S5D-SRCRB, and/or that expression of S5D-SRCRB by IC may change under unknown physiologic conditions. In any case, the co-localization -either total or partial- with AQ2 and VB1 ATPase, pointed out that the S5D-SRCRB protein is certainly expressed in CD.

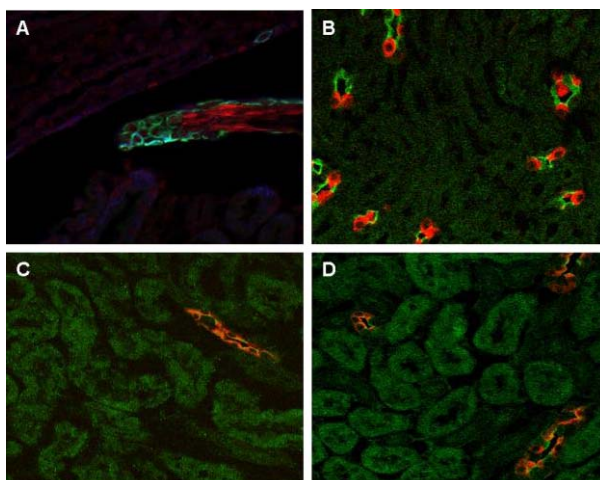


Figure 2. Colocalization of S5D-SRCRB with different renal cell-specific markers. Paraformaldehyde-fixed mouse kidney sections (A, renal pelvis; B-D, cortical-medullar regions) were triple (A) and double (B-D) stained for S5D-SRCRB and kidney cell-specific markers. A, co-localization of S5D-SRCRB (red) with renal stem cell markers cytokeatin5 (blue) and $\alpha 6$ -Integrin (green). B, co-localization of S5D-SRCRB (green) and VB1 ATPase (red). C and D, co-localization of S5D-SRCRB (green) and AQ2 (red). Visualization was performed by confocal microscopy. Magnification x60 (A) and x40 (B, C and D).

Analysis of S5D-SRCRB expression in the clone C cell model of IC differentiation

To further address whether IC cells express S5D-SRCRB, as well as which subtype of IC would express it, a widely-accepted in vitro cellular model of IC differentiation was used (Al-Awqati and Gao 2011). This model involves the use of clone C cells at different cell densities. Clone C cells, a cell line derivated from rabbit primary β -IC cells, develops a phenotype similar to subtype β -IC or α -IC when seeded at low-density (LD) or high-density (HD), respectively. The β -IC and α -IC subtypes represent two differentiated states of the same cell type in response to different pH blood conditions (low pH for β -IC and high for α -IC) (van Adelsberg, Edwards et al. 1994). Thus, clone C cells cultured at both HD and LD in transwell filters were fixed and subjected to permeabilization and non-permeabilization conditions before staining for S5D-SRCRB and further observation by epiluminescence microscopy.

Under non-permeabilization conditions, cells seeded at HD stained stronger for S5D-SRCRB than LD cells (Fig 3A and 3C), and showed a diffuse staining pattern suggestive of expression at the epithelial surface. As shown in Fig 3C, most LD cells stained low or negative for S5D-SRCRB, with only a few isolated cells presenting a scattered positive staining. Interestingly, when stained following permeabilization with saponin (Fig. 3B and 3D), HD cells remained positive for a diffuse staining pattern, while LD cells became positive for a coarse scattered pattern suggestive of S5D-SRCRB expression in intracellular vesicles.

In order to fully ascertain whether S5D-SRCRB was expressed intracellularly or extracellularly in HD and LD seeded cells, a further set of experiments were performed in which permeabilized cells were double stained for actin (phalloidin) and S5D-SRCRB followed by observation by confocal microscopy and 2D-image reconstructions. As shown in Fig 4A-4D, HD cells stained positive

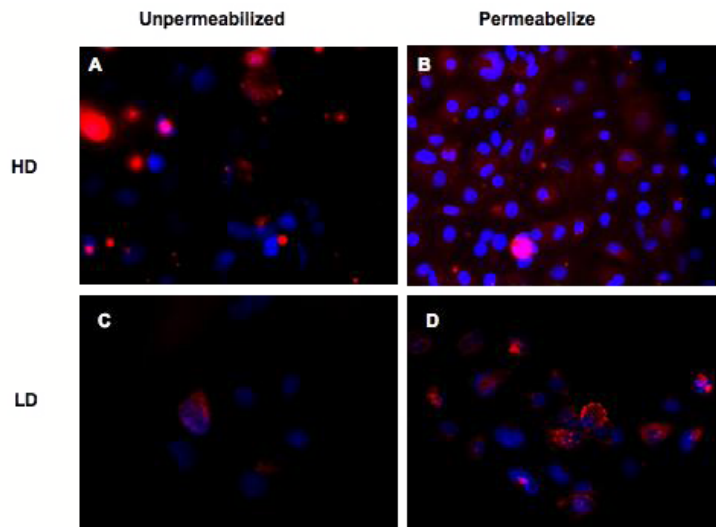


Figure 3. Expression of S5D-SRCRB in clone C intercalated cells cultured at High (HD) or Low (LD) density. Clone C cells cultured at HD or LD were stained for S5D-SRCRB under basal or permeabilization conditions, as described in the Material and Method section. Texas Red-labeled donkey anti-rat Ig (red) was used as secondary antibody. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Visualization was performed by epifluorescence microscopy. Magnification x60.

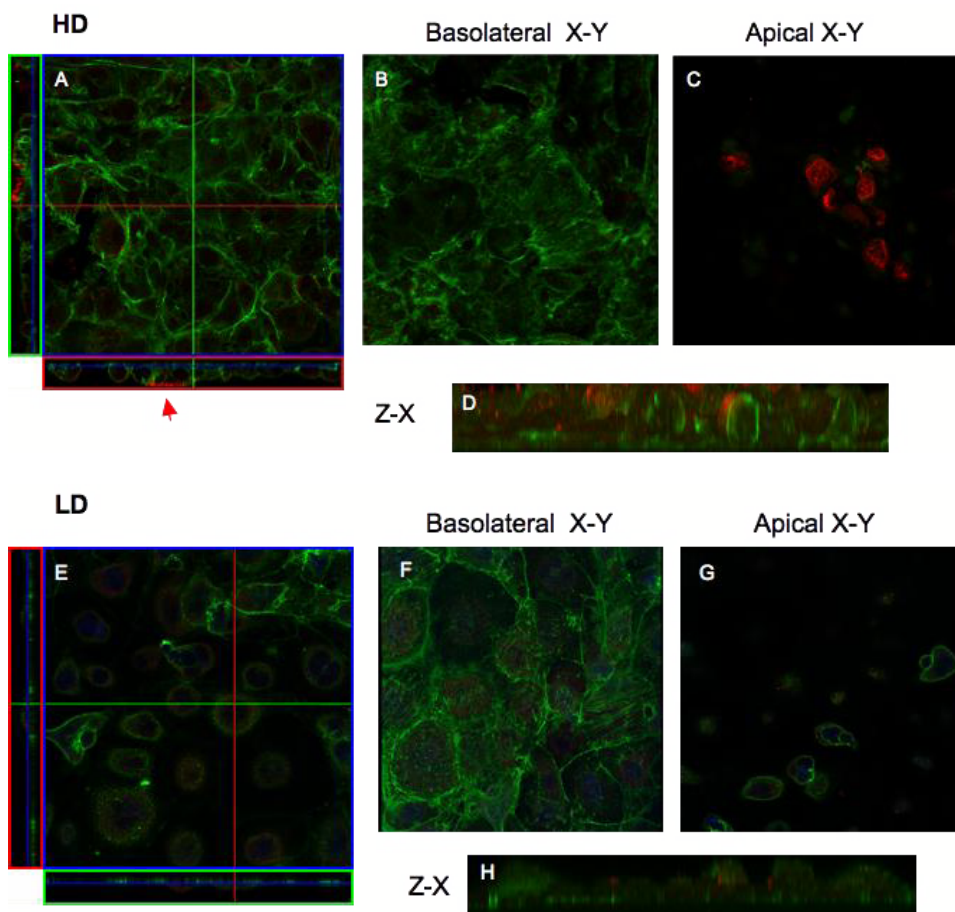


Figure 4. Localization of S5D-SRCRB in clone C intercalated cells cultured at High (HD) or Low (LD) density. Low and high density seeded cells were fixed and permeabilized, then incubated with a rat anti-S5D-SRCRB antibody, as described. After samples were washed, donkey anti-rat Texas Red was added plus phalloidin-FITC. Nuclear staining was performed by incubating with ToPro3 (blue). Magnification x60 from X-Y (square) and Z (rectangle) projection.

for S5D-SRCRB at the apical (Fig. 4C) but not the basolateral side (Fig. 4B). This was confirmed by Z (Fig 4A, top) and X-Z (Fig 4D) optical sections in which cells with a columnar/cuboidal morphology typical of α -IC cells showed preferential positive staining for S5D-SRCRB at the apical border. Regarding LD cells (Fig. 4E-4H), the S5D-SRCRB staining was generally low, with most cells presenting a diffuse cytoplasmic pattern but with some presenting a vesicular-like pattern. Whatever the case, no preferential distribution at the apical or basolateral sides was observed. This is well illustrated by X and Z-X sections, in which the typical flattened morphology of β -IC is observed (Fig. 4E and 4H). Taken together, these results indicate that S5D-SRCRB is mainly expressed intracellularly (in cytosolic organelles) in LD cells but extracellularly (attached to the apical side) in HD cells.

Galectin-3 interacts S5D-SRCRB and shows partial co-localization along the urogenital tract

Galectins-1 and -3 but not other galectins (2, 5, 6, 7 and 9) are known to be differentially expressed in kidney (Vanstherthem et al. 2010). While Galectin-1 is mainly expressed in interstitial and peritubular cells, Galectin-3 is preferentially expressed in cells of collecting ducts. This fact, together with the previously reported association of DMBT1/Hensin with Galectin-3 (Hikita, Vijayakumar et al. 2000) and the immunolocalization of S5D-SRCRB in Principal (P) and IC cells of collecting ducts (CD) prompted us to explore a possible interaction of this protein with Galectin-3. The feasibility of this interaction was favored by the recently reported interaction of S5D-SRCRB with Galectin-1 (Miro-Julia, Rosello et al. 2011). Thus, pull-down and ELISA assays were performed to demonstrate a putative direct *in vitro* interaction between soluble recombinant forms of both S5D-SRCRB (rmS5D-SRCRB-HA) and Galectin-3 (GST-Gal-3). As illustrated in Fig. 5A, S5D-SRCRB associated with GST-Gal-3 but not GST alone, and this interaction was competed in a dose-dependent manner by lactose (a specific ligand of galectins) but not by an unspecific sugar (sucrose). Similarly, direct ELISA binding assays showed that rmS5D-SRCRB-HA interacts in a dose-

dependent (3–30 mM) manner with GST-Gal-3 but not with a GST-Gal-3 mutant (R186S) whose lectin activity has been disrupted (Fig. 5B). This result confirms that the interaction of both proteins takes place through the lectin binding domain Gal-3.

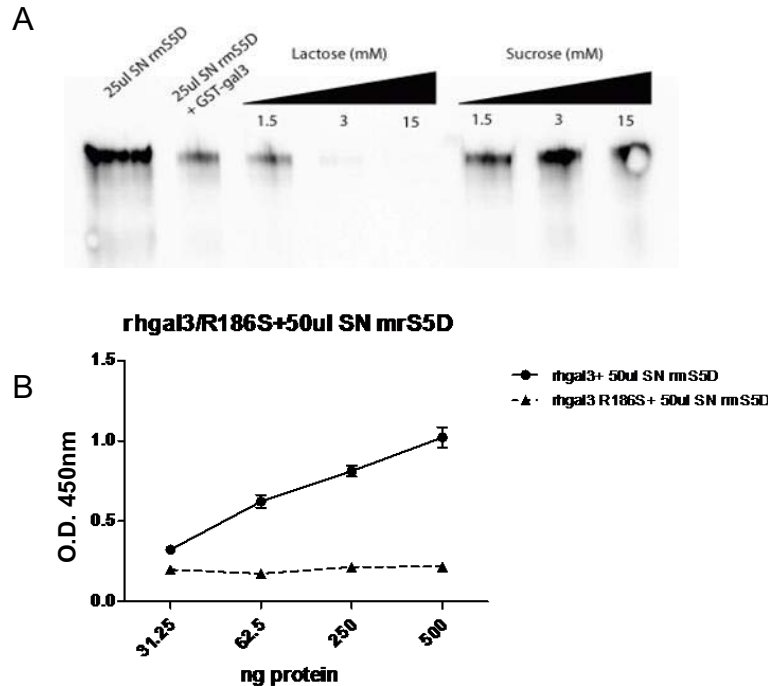


Figure 5. Carbohydrate-dependent interaction of S5D-SRCRB with Galectin-3. A, Pull-down assay showing dose-dependent inhibition of Gal-3 interaction with rmS5D-SRCRB-HA by lactose but not sucrose. Glutathione sepharose beads coated with GST-Gal-3 were incubated with S5D-SRCRB in the presence or absence of increasing concentrations (3, 15, and 30 mM) of competing (lactose) or non-competing (sucrose) sugars. Protein complexes were solved in 8% SDS-PAGE under reducing conditions for further Western blot analysis with Streptavidin-POD (dilution 1:1000). Chemiluminescence results are presented. B, ELISA binding assay showing the interaction of S5D-SRCRB with wild type (WT) and R186S mutant Gal-3 proteins. ELISA plates coated with increasing amounts of WT and R186S mutant Gal-3 were incubated with rmS5D-SRCRB-HA. Bound protein was detected and then developed with 1H11.A8.G2 mAb plus HRP-labeled anti-rat IgG. Results are shown as absorbance at 450nm (O.D.).

During the late period of fetal maturation, the expression of Gal-3 by urinary bladder (Nio, Takahashi-Iwanaga et al. 2006) and ureteric bud (Bullock, Johnson et al. 2001) has been well studied. On the other hand, our results showed expression of S5D-SRCRB in these cells. To examine an environment where S5D-SRCRB and Gal-3 could likely interact, we stained sections of male adult mouse testis, kidney, urinary bladder and ureters with anti-S5D-SRCRB and anti-Gal3 antibodies. The medullar CD, transitional epithelia of the ureter and urinary bladder are intensively immunoreactive for Gal-3 in all layers (Fig 6), while in testis Gal-3 expression is limited to Leydig cells. As described above, stronger S5D-SRCRB-staining was observed in vesical mesenchyme

(from tailbud-derived mesenchyme) of urinary bladder and transition epithelia of ureters, while transition epithelia of urinary bladder showed a diffuse expression of S5D-SRCRB (Fig 6). On the other hand, Gal-3 expression is mainly cytoplasmic in renal CD, but in some cells (very likely α -IC) it is located at the apical side and partially co-localizing with S5D-SRCRB.

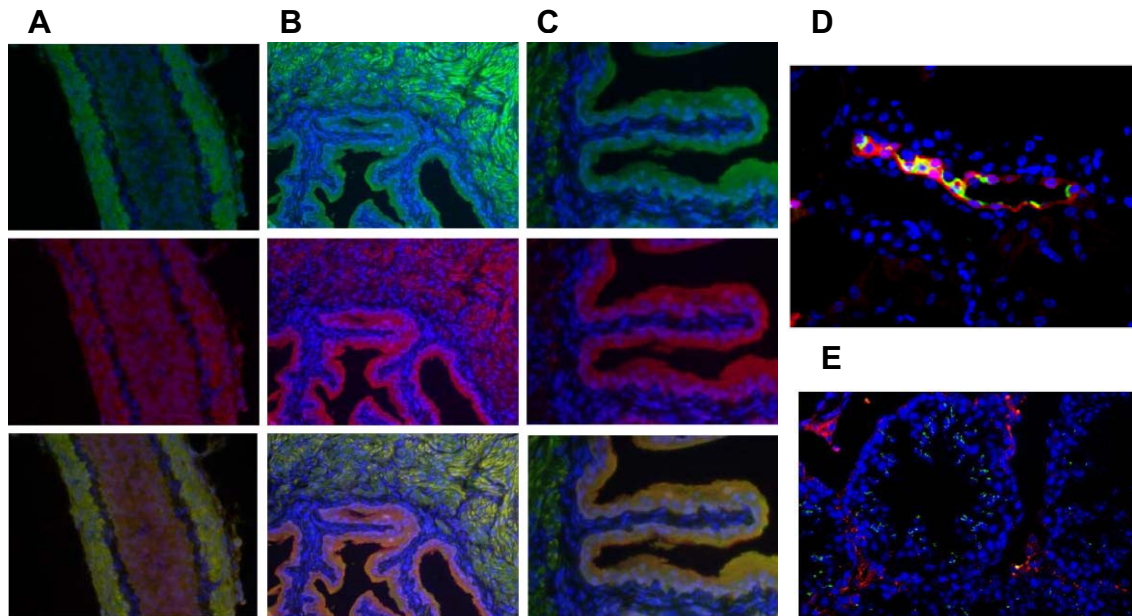


Figure 6. Immunofluorescence images from the mouse Ureter, Urinary bladder, kidney and testis. (A), ureter, (B and C) urinary bladder, (D) kidney and (E) testis merged images are shown where an antibody to S5D-SRCRB (in green) was used together with an anti-Gal-3 antibody (in red). Nuclear staining was performed with DAPI. Magnification 10x and x40.

Up-regulated Expression of S5D-SRCRB in kidney cells following exposure to bacterial products

It has been shown that S5D-SRCRB not only binds to bacteria but also prevents subsequent pro-inflammatory cytokine release by bacterial components such as PGN, thus supporting a role in mucosal defence and inflammation. To further address the putative defensive role of S5D-SRCRB, *in vitro* and *in vivo* experimental models explored its expression under microbial aggression conditions. First, clone C collecting duct cells cultured at LD or HD were exposed to PGN from *Staphylococcus aureus* for 24h, and then stained for S5D-SRCRB expression under non-permeabilization conditions. As illustrated by Fig. 7A, HD cells did not suffer any significant increment in S5D-SRCRB expression following PGN exposure. By contrast, LD cultures, which present lower constitutive expression levels of S5D-SRCRB compared to HD, significantly

increased its expression upon stimulation with PGN (Fig. 7A). These results open the possibility that either bacteria or their products (e.g., PGN) may up-regulate renal cell expression of S5D-SRCRB, at least at the collecting ducts level. This hypothesis was tested by analyzing mRNA S5D-SRCRB levels in the kidneys of mice undergoing an experimental urinary tract infection (UTI). This mouse model of UTI implies the colonization of urinary bladder by a uropathogenic *E. coli* (UPEC) strain and further ascendent dissemination of the infection to the kidneys through the ureters over 24h period. At this time point, although its parenchyma is not damaged and functionally compromised, kidneys sense the aggression and start signalling pathway to fight the infection. For this assay, mice (n=5) were inoculated via urethra with either UPEC or vehicle and after 24h one kidney was used to check the presence or absence of UPEC, and the other to carry out RT-qPCR analyses of *s5d-srcrb* expression. As shown in Fig. 7B, the mRNA level of *s5d-srcrb* was up-regulated ($Ct \cong 0.5$) in kidneys from infected mice compared to those inoculated with vehicle. Although this difference did not reached statistical significance ($p < 0.1$), very likely due to the inherent variability of the UTI model, it is in line with the above mentioned *in vitro* studies suggesting that S5D-SRCRB expression is up-regulated following exposure to bacterial products.

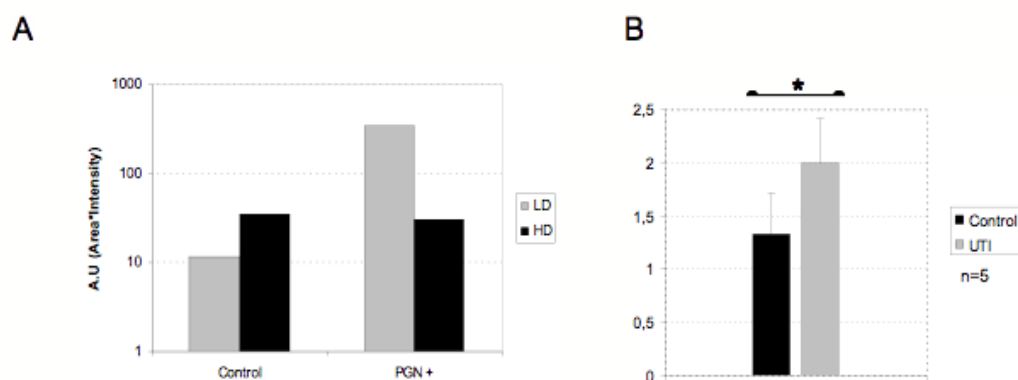
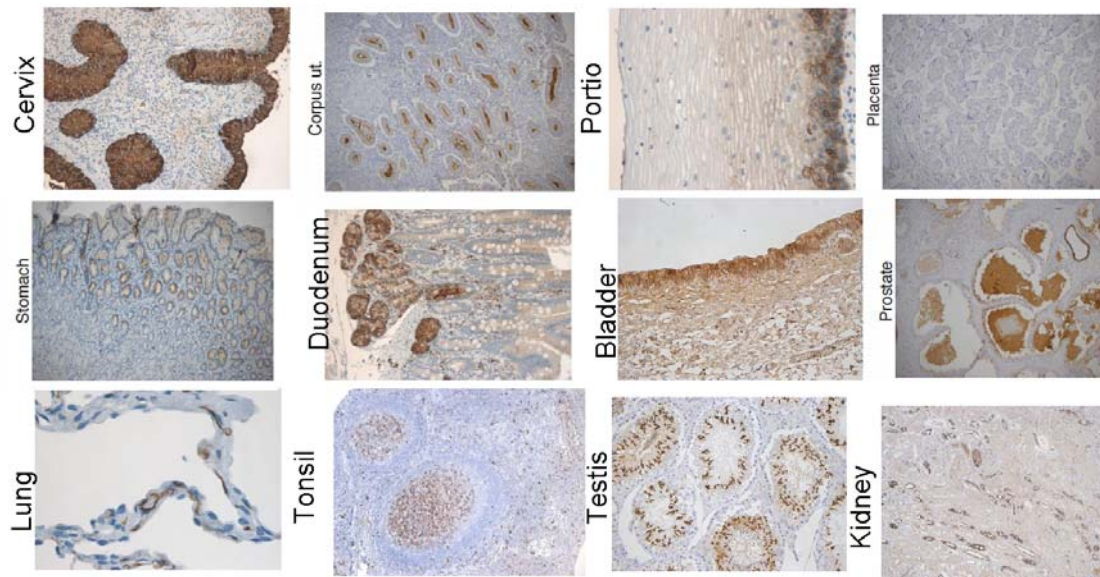
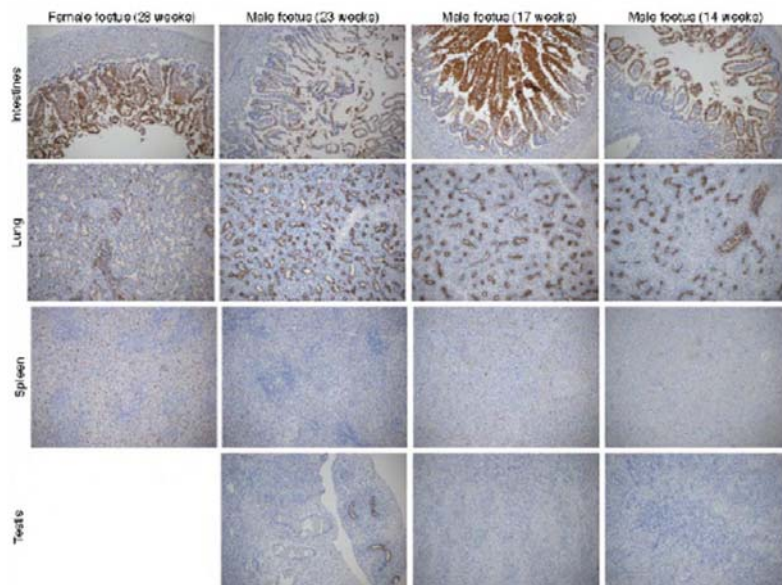


Figure 7. Pathogen-induced up-regulation of S5D-SRCRB expression in clone C cells and kidney. A, Quantification of S5D-SRCRB staining of clone C cultured at High (HD) or Low (LD) density under non-permeabilization conditions in the presence or absence of peptidoglycan (PGN; 20ug/mL) for 24h. Cells were stained with anti-S5D-SRCRB (4D11.A2.H4) plus TR-labeled anti-rat Ig. Images were visualized by confocal microscopy. S5D-SRCRB signal in each image stack was quantitated by free Image J software and represented as arbitrary units (A.U). B, RT-qPCR expression of S5D-SRCRB in mouse kidney from mice undergoing experimental urinary tract infection (UTI). mRNA was isolated from kidney of controls and 24h post-infection. Relative gene copy number was normalized to housekeeping *GAPDH* and expressed as arbitrary units with error bars from duplicates. A representative experiment of three performed is shown. n=5 (*) p<0,1.

Supplementary data



SI Figure 1. Adult tissue-expression analysis of human S5D-SRCRB. Immunohistochemical staining of paraffin-embedded human tissue sections with rat 1H11.A8.G2 mAb (1:10 dilution). Development was carried out with HRP-conjugated anti-rat IgG and nuclear counterstaining in Mayer's hematoxylin (original magnification $\times 10$).



SI Figure 2. Tissue-expression analysis of human S5D-SRCRB during embryogenesis, from 14 to 28 post-conception. Immunohistochemical staining of paraffin-embedded human tissue sections with rat 1H11.A8.G2 mAb (1:10 dilution). Development was carried out with HRP-conjugated anti-rat IgG and nuclear counterstaining in Mayer's hematoxylin (original magnification $\times 10$).

Discussion

S5D-SRCRB/SSc5D is a new member of group B SRCR-SF recently reported in human and mouse. Regarding the human gene, SSc5D, (Goncalves, Castro et al. 2009), only genomic and mRNA information is available, with no data at the protein and functional level. During the characterization of the mouse homologue, S5D-SRCRB, two mAbs were developed that cross-react with human and murine proteins (Miro-Julia, Rosello et al. 2011). Using one of these mAbs, an extensive IHC study was performed, which showed that human S5D-SRCRB protein expression correlates with preliminary data at RNA level (Goncalves, Castro et al. 2009). Human S5D-SRCRB is mainly expressed in gastrointestinal and urogenital tract, which are sites of potential exposure to microbes. This expression pattern is similar to the one described for the homologous mouse protein (Miro-Julia, Rosello et al. 2011).

In this report, it has been shown the anti-S5D-SRCRB mAb stained specific structures of mouse testis, urinary bladder, ureter and kidney. Moreover, our results show that S5D-SRCRB is expressed in papilla, close to stem cells, as well as in principal and some intercalated cells (IC) of collecting ducts.

From the renal cortex to the papilla, the kidney presents a strong gradient of anoxia and osmolarity. Both situations are sensed by different proteins and constitute a signal for processes such as cell migration, proliferation, vascular remodeling, cell differentiation, apoptosis and cancer (Burg, Ferraris et al. 2007; Halterman, Kwon et al. 2012). Hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) functions as a master regulator of oxygen homeostasis in almost all nucleated mammalian cells (Liu, Shen et al. 2012). The expression of S5D-SRCRB, which occurs at higher levels in papilla and pelvis than in renal cortex, is regulated by a promoter element that possesses three putative binding sites for the HIF-1 transcriptional factor (data not shown). This suggests a possible role for S5D-SRCRB in tissues downstream of HIF-1 and hypoxia sensing.

The renal papilla contains a population of cells with several characteristics of adult stem cells, including the retention of proliferation markers during long chase periods (i.e., they are label-retaining cells (LRCs)) (Oliver, Klinakis et al. 2009). It is broadly accepted that the renal papilla is a unique environment, with gradients of low oxygen tension and marked osmolarity (Zhang and Edwards 2002; Sadowski and Dobrowolski 2003), that are likely to be important in the functional regulation of this area (Oliver, Klinakis et al. 2009). Our data indicate that S5D-SRCRB staining increases with osmotic hypertonicity and hypoxia gradients. Moreover, LRC cells in papilla, which are known to be related to both gradients, lie in close vicinity with S5D-SRCRB-stained papilla structures.

In order to better characterize the expression pattern of S5D-SRCRB in IC cells, a rabbit cell model of IC differentiation was used. This model revealed that preferential expression of S5D-SRCRB occurred in terminally differentiated IC. IC cells can be divided in two groups according to their phenotype: the subtype β -IC secretes bicarbonate into urine and absorbs protons into the bloodstream, while the subtype α -IC does the opposite, secreting protons and absorbing bicarbonate. Both contribute to pH maintenance in blood and urine. In the CD β -IC undergo terminal differentiation and convert to α -IC, showing cell plasticity; as part of this process, DMBT1 is secreted through the basolateral region of the cell and interacts with ECM proteins such as Gal-3, among others. This process was studied using a cell line derived from rabbit IC, called clone C. Seeded at low density (LD), clone C shows properties of β -IC cells, while seeded at high density (HD), it shows an α -IC phenotype (Al-Awqati and Gao 2011). S5D-SRCRB is expressed in both clone C phenotypes (LD and HD), but in different locations. While S5D-SRCRB is barely detectable in non-permeabilized LD cultures, S5D-SRCRB staining is clear on the apical side of HD. However, once permeabilized both low- and high-density clone C cells show the same intracytoplasmic expression pattern. Although these results clearly show that S5D-SRCRB expression correlates with IC cell differentiation states, results so far do not explain whether this distinct expression is a cause or a consequence

of cell differentiation. Interestingly, S5D-SRCRB expression changes during the developmental process, decreasing in most epithelia, but increasing in the testis. Changes in *s5d-srcrb* expression levels were also reported in mice at 9 and 14 dpc, and strong *s5d-srcrb* positive staining was observed in murine placodes by HIS assay (Miro-Julia, Rosello et al. 2011). Thus, it could be the case that S5D-SRCRB plays a role in cell differentiation in a cell type-specific manner.

As previously mentioned, studies performed on a rabbit cell model of IC differentiation revealed preferential expression of S5D-SRCRB in terminally differentiated IC; however, this expression pattern was reversed after exposure to bacterial peptidoglycan.

Pattern recognition receptors (PRRs) are thought to recognize foreign ligands during early phases of the immune response. The best known of these PRRs are the Toll-like receptors (TLRs), but an emerging set of receptors, like Carbohydrate-binding C-type lectin receptors (CLRs) and Scavenger receptors (SRs), are known to play an important role in the immune system (Martinez, Moestrup et al. 2011; Kingeter and Lin 2012). Several of these recognize endogenous as well as exogenous ligands, suggesting that they might play a dual role in normal tissue function and host defense. Focusing on the genitourinary tract, both human and mouse renal IHC studies showed that S5D-SRCRB staining increases from the kidney to the urinary bladder, correlating with higher exposure to uropathogenic microbes.

Interestingly, binding studies indicated that S5D-SRCRB interacts with the carbohydrate-binding region of Galectin-3, and likely this interaction has a functional role in kidney collecting ducts, urinary bladder and ureters, but not testis seminiferous tubules; these results are in agreement with former biochemical studies and our double staining assay. Moreover, dectin-1 has been reported to interact with Galectin-3, and this interaction enhances its ability to sense pathogens (Esteban, Popp et al. 2011); a similar role could be postulated

for S5D-SRCRB based on functional similarities in both proteins.

Galectins, an evolutionarily conserved family of β -galactoside-binding proteins with a carbohydrate recognition domain (CRD), exemplify the emerging understanding of PRRs. Since their discovery in the 1970s, their biological roles, initially understood as limited to recognition of carbohydrate ligands in embryogenesis and development, have expanded in recent years through the discovery of their immunoregulatory activities (Vasta, Ahmed et al. 2012). For instance, Galectin-3 secretion is known to induce terminal differentiation in epithelial cells (Hikita, Vijayakumar et al. 2000), but at the same time Gal-3 plays role in defence against pathogens (Kohatsu, Hsu et al. 2006). Moreover, it has been reported that PRRs from different families can interact to recognize specifically PAMPs. TLR2 and dectin-1 synergize with Gal-3 to recognize specific PAMPs (β -linked mannosides of *Candida albicans*, for instance) and mediate responses against pathogens, but not against saprophytic flora (Jouault, El Abed-El Behi et al. 2006). By Western blotting and IF, we have shown that S5D-SRCRB interacts with Gal-3. This recognition is specifically mediated by the carbohydrate binding domain of Gal-3, as shown by competition assays and the CDR mutated Gal-3 binding studies. Taken together, our results indicate that, once released, S5D-SRCRB binds to Gal-3 in some regions of the urinary system (for instance, ureters and urinary bladder), thus putatively contributing to basic homeostatic epithelial cell functions. It is also likely that interaction between Gal-3 and S5B-SRCRB contributes to PAMP recognition, as is the case with Gal-3 and dectin-1 (Esteban, Popp et al. 2011).

In CD, S5D-SRCRB stains principal cells and some IC, most probable α -IC, as clone C studies indicate. Renal collecting duct epithelial cells are known to mediate innate immune responses in kidney through TLRs (mainly 2 and 4) (Tipping 2006), as well as other kinds of proteins (for example KLF5) (Fujiu, Manabe et al. 2011). Our results showed that luminal S5D-SRCRB expression increased when LD clone C cultures were exposed to bacterial wall components. Moreover, *s5d-srcrb* was shown to be slightly up regulated in kidney in the UTI infection model (first 24h post-infection). This up-regulation could be

modulated by the NF- κ B signaling pathway, as it has been reported for DMBT1 (the paradigmatic member of group B SRCR-SF) (Rosenstiel, Sina et al. 2007), since the *s5d-srcrb* promoter possesses several NF- κ B transcription factor binding sites in its sequence (data not shown).

Both innate and adaptive components of the immune system, as well as stromal cells including bladder epithelium, are involved in the prevention and clearance of UTI, which is the most common non-epidemic bacterial infection in humans. The urogenital tract has its own strategy (which does not comprise typical physical barriers such as mucus) to prevent infections; it relies mainly on a ciliated epithelium and highly complex glycomoiety from proteins upholstering urogenital lumen (Säemann M. D. et al., 2005).

It is known that in the UTI mouse model 24h are enough for the infection to be established in the urinary bladder infection and also to affect ureters, while travelling up to the kidney following the urinary tract. Although kidneys are not still affected during the early phases of the urinary infection, they can be invaded by bacteria that later on will affect their physiology. This result, and the fact that S5D-SRCRB binds to gram positive and negative bacteria, suggests that this protein could be involved in the protective innate response of the urinary system since the very early phases of an infection.

Further studies are required to assess the functional role of the Gal-3 and S5D-SRCRB interaction, and to better understand how S5D-SRCRB intervenes in cell differentiation and innate defence. However, the available data clearly show that S5D-SRCRB is a well characterized marker for lower urinary tract, and variations in its expression are related to changes in tissue homeostasis.

Capítol III

Deletion of hensin/DMBT1 blocks conversion of beta- to alpha-intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis.

XiaoBo Gao^a, Dominique Eladari^{b,c}, Françoise Leviel^{b,c}, Ben Yi Tew^a, Cristina Miró-Julià^a, Faisal H. Cheema^a, Lance Millar^d, Raoul Nelson^d, Teodor G. Paunescu^e, Mary McKee^e, Dennis Brown^e, and Qais Al-Awqati^{a,1}

^aDepartments of Medicine and Physiology and Cellular Biophysics, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York, NY 10032; ^bUniversité Paris 06 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche Scientifique 872 Team 3 and Centre National de la Recherche Scientifique ERL7226, Laboratoire de Génomique, Physiologie et Physiopathologie Rénales, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France; ^cFaculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France; ^dDepartment of Pediatrics, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84132; and ^eProgram in Membrane Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114

Proc Natl Acad Sci USA (PNAS). 2010 Dec 14;107(50):21872-7. Epub 2010 Nov 22.

PMID: 21098262 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Resum.

El transport àcid-bàsic en els túbuls col·lectors renals es deu a l'acció de dos tipus cel·lulars canònics. Un d'ells, la cèl·lula intercalada tipus β , que secreta grups HCO_3 per un transportador apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3$ -anomenat pendrin- i per un de vacuolar basolateral -anomenat V-ATPasa-. La secreció àcida és realitzada per cèl·lules intercalades tipus α , que tenen una ATPasa apical i un transportador basolateral $\text{Cl}:\text{HCO}_3$, anomenat kAE1. Previament s'havia suggerit que les cèl·lules- β es convertien en cèl·lules- α , un procés que depèn de la secreció i diposició d'una proteïna de l'ECM anomenada Hensin (DMBT1), en resposta a una dieta àcida. En el present estudi, es mostra que la delecció de Hensin en les cèl·lules intercalades dóna lloc a l'absència de cèl·lules- α prototípiques i en conseqüència es desenvolupa una acidosi tubular renal distal (ATRD) total. Totes les cèl·lules intercalades en l'escorça renal dels ratolins mutants són bàsicament cèl·lules- β canòniques, amb pendrin apical i la V-ATPasa basolateral o difusa/bipolar. A la medul·la, però, s'ha descobert un tipus de cèl·lula no descrit prèviament que presenta una ultraestructura similar a la de les cèl·lules intercalades- β corticals, però que no expressa pendrin. La polimerització i deposició de Hensin (en resposta a l'acidosi) requereix l'activació de la proteïna $\beta 1$ -integrina, i la delecció d'aquest gen en les cèl·lules intercalades dóna lloc a un fenotip idèntic a l'observat quan Hensin és deleccionat, indicant així que $\beta 1$ -

integrina és crítica en la funció de Hensin. En estudis previs s'havia suggerit que la conversió de cèl·lules intercalades- β a $-\alpha$ era el resultat d'una diferenciació terminal. Segons les dades aquí s'exposades, la diferenciació de les cèl·lules intercalades dóna lloc a la transformació d'un fenotip secretor de grups HCO_3 a un altre que secreta protons, i aquest procés requereix la deposició de Hensin a l'ECM.

Deletion of *hensin/DMBT1* blocks conversion of β - to α -intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis

XiaoBo Gao^a, Dominique Eladari^{b,c}, Françoise Leviel^{b,c}, Ben Yi Tew^a, Cristina Miró-Julà^a, Faisal Cheema^a, Lance Miller^d, Raoul Nelson^d, Teodor G. Păunescu^e, Mary McKee^e, Dennis Brown^e, and Qais Al-Awqati^{a,1}

^aDepartments of Medicine and Physiology and Cellular Biophysics, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York, NY 10032; ^bUniversité Paris 06 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche Scientifique 872 Team 3 and Centre National de la Recherche Scientifique ERL7226, Laboratoire de Génomique, Physiologie et Physiopathologie Rénale, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France; ^cFaculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France; ^dDepartment of Pediatrics, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84132; and ^eProgram in Membrane Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114

Edited by Michael J. Welsh, University of Iowa, Iowa City, IA, and approved October 26, 2010 (received for review July 19, 2010)

Acid–base transport in the renal collecting tubule is mediated by two canonical cell types: the β -intercalated cell secretes HCO_3^- by an apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ named pendrin and a basolateral vacuolar (V)-ATPase. Acid secretion is mediated by the α -intercalated cell, which has an apical V-ATPase and a basolateral $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchanger (kAE1). We previously suggested that the β -cell converts to the α -cell in response to acid feeding, a process that depended on the secretion and deposition of an extracellular matrix protein termed *hensin* (DMBT1). Here, we show that deletion of *hensin* from intercalated cells results in the absence of typical α -intercalated cells and the consequent development of complete distal renal tubular acidosis (dRTA). Essentially all of the intercalated cells in the cortex of the mutant mice are canonical β -type cells, with apical pendrin and basolateral or diffuse/bipolar V-ATPase. In the medulla, however, a previously undescribed cell type has been uncovered, which resembles the cortical β -intercalated cell in ultrastructure, but does not express pendrin. Polymerization and deposition of *hensin* (in response to acidosis) requires the activation of $\beta 1$ integrin, and deletion of this gene from the intercalated cell caused a phenotype that was identical to the deletion of *hensin* itself, supporting its critical role in *hensin* function. Because previous studies suggested that the conversion of β - to α -intercalated cells is a manifestation of terminal differentiation, the present results demonstrate that this differentiation proceeds from HCO_3^- secreting to acid secreting phenotypes, a process that requires deposition of *hensin* in the ECM.

The intercalated cells (ICs) of the kidney mediate acid–base transport and exist in two functionally distinct subtypes (1): the β -type secretes HCO_3^- , whereas the α -form secretes H^+ . An apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchanger and a basolateral vacuolar H^+ -ATPase (V-ATPase) mediate secretion of base by the β -cells, whereas α -cells secrete acid by an apical V-ATPase and a basolateral $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchanger. In both cell types, the same or a very similar V-ATPase is located in the apical membrane of the α -form and in the basolateral membrane of the β -type (2, 3). The apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchanger of the β -intercalated cell is pendrin (Slc26a4) (4), whereas the basolateral exchanger of the α -cell is an alternately spliced form of the red cell anion exchanger, AE1 (Slc4a1).

Metabolic acidosis converts the collecting tubule from a state of HCO_3^- secretion to HCO_3^- absorption (i.e., H^+ secretion). We found that the number of β -intercalated cells was reduced by metabolic acidosis, whereas the number of α -intercalated cells increased. However, the total number of intercalated cell remained the same (1). We interpreted these results as indicating that the β -intercalated cell converts to an α -phenotype. Although the nomenclature is somewhat contentious, there is no doubt about the presence of an acid secreting “canonical” α -cell type with an apical V-ATPase and a basolateral AE1 and β -cell type with an apical pendrin and a basolateral V-ATPase. The presence of intermediate cells raises many questions about the origin and diversity of these cell types, and some AE1-negative intercalated cells display bipolar and/or a diffuse cytoplasmic distribution of the V-ATPase (2, 3)

and some cortical intercalated cell types express pendrin and the V-ATPase on the apical surface (the so-called non-A non-B type) (4). Induction of metabolic acidosis or alkalosis produces a profound change in the population distribution of these different cell types with acidosis shifting the distribution to the type with apical ATPase, whereas alkalosis increases the number of canonical β -cells at the expense of α -cells (5, 6). That an individually identified β -intercalated cell actually converts to an α -intercalated cell was provided more recently when we found that its exposure to a basolateral low pH medium caused a significant fraction of such cells, which had an apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchanger to convert to ones with basolateral $\text{Cl}:\text{HCO}_3^-$ exchangers (7). However the molecular identity of these exchangers was not identified.

To identify the molecular basis of the conversion, we generated a clonal immortalized cell line of a rabbit β -intercalated cell and found that when these cells were seeded at subconfluent density and allowed to form confluent monolayers they developed into HCO_3^- secreting cells (8). We discovered that the α -resembling intercalated cells deposited an extracellular matrix protein which, when purified, was able by itself to induce conversion of intercalated cells seeded at low density to a cell type that resembled the α -intercalated cell. We termed this protein *hensin* (9) (also termed DMBT1 by the Mouse Genome Project). We proposed that the conversion of intercalated cells is an example of terminal differentiation (10). *Hensin/DMBT1* is expressed in most epithelia, often in alternately spliced forms, suggesting that *hensin* might be involved in the differentiation of other epithelia as well. That global deletion of *hensin* resulted in early embryonic lethality at the time of appearance of the first columnar epithelium, visceral endoderm, supported this proposal. *Hensin/DMBT1* *hensin* has been found to be deleted in a large number of epithelial malignancies, again supporting its role in epithelial differentiation (see ref. 10 for review).

Here we have conditionally deleted *hensin* from intercalated cells and found that this resulted in an almost complete absence of typical α -intercalated cells as defined by existing standard markers of this cell type. Activation of integrin $\beta 1$ was necessary for polymerization and deposition of *hensin* in the ECM (11) and here we found that deletion of $\beta 1$ integrin in the intercalated cells also prevented the conversion of β - to α -intercalated cells. Furthermore, the presence of only HCO_3^- -secreting β -cells, as expected produced complete distal renal tubular acidosis (dRTA).

Author contributions: D.E., D.B., and Q.A.-A. designed research; X.G., D.E., F.L., B.Y.T., C.M.-J., T.G.P., M.M., and D.B. performed research; F.C., L.M., R.N., and D.B. contributed new reagents/analytic tools; X.G., D.E., D.B., and Q.A.-A. analyzed data; and D.B. and Q.A.-A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: qa1@columbia.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1010364107/-DCSupplemental.

Results

Conditional Deletion of Hensin. We found that hensin is secreted as a monomer by the low-density phenotype of immortalized intercalated cells (the β -intercalated cell equivalent) and that acidosis (or high-density seeding) led to its polymerization and deposition in the ECM. To delete hensin from the intercalated cells we constructed a loxPhensin mouse line as shown in Fig. S1A. We crossed this line with one expressing Cre under the control of the HoxB7 promoter, resulting in deletion of hensin in the entire collecting duct (Fig. S1B). We also bred loxPhensin mice to those expressing Cre under the control of the promoter for the B1 subunit of the V-ATPase, which is expressed at high levels in the intercalated cells (we refer to this line of mice as the VB1Cre line) (Fig. S1C) (12). A critical initial step was that activation of hensin polymerization requires inside out signaling of $\beta 1$ integrin (11). Hence, we crossed the VB1Cre mice with mice expressing a LoxP integrin $\beta 1$ transgene (Fig. S1D). This cross resulted in deletion of this integrin from the intercalated cell lineage (Fig. S2). All resulting progeny of the crosses showed Mendelian ratios of mutant and wild-type pups. The animals were fertile and appeared in good health.

We examined the expression of hensin by Western blot analysis. Comparison of the intensity of the bands from wild-type mice to those of the three mutant lines is shown in Fig. S1E. We used two loading markers, an ECM protein laminin and an anonymous band in the Ponceau Red stained blots. There was no significant difference in the use of these two markers. Fig. S1E shows a representative gel taken from four independent studies where all of the lanes of wild-type and the three mutant lines provided interpretable results and were present in the same gel. The collecting duct-specific (HoxB7) mutants had reduced expression of hensin protein on average to 34% of the wild-type levels. That it did not reduce it to 0% is likely due to the recently reported lack of expression of the Cre recombinase in some parts of the connecting tubule (ref. 13 and see below). The intercalated cell-specific mutant (VB1Cre) mice reduced their hensin protein expression to 69% of wild type, a value compatible with the finding that intercalated cells represent 39% of the mouse collecting tubule cells (see below). The levels of hensin in the $\beta 1$ integrin Cre mice were no different from the wild type, as expected. These results demonstrate that hensin was indeed deleted from the intercalated cells in these mice. All primers are presented in Table S1 and the PCR screening strategy is described in Fig. S3.

Hensin Knockout Causes Distal Renal Tubular Acidosis. All three lines of mutant mice had significant metabolic acidosis with plasma HCO_3^- concentration and pH both lower than their wild-type littermates (Fig. 1). The urine pHs were higher in the mutant mice than in the wild type animals. These studies were performed using the iSTAT analyzer, which uses a variety of electrodes to estimate pH and pCO_2 . We also measured pCO_2 and pH by traditional clinical blood gas analyzer in retroorbital mixed venous blood taken from awake and spontaneously breathing mice and found that those results showed that mutant mice had metabolic acidosis. These studies demonstrate that deletion of hensin results in spontaneous complete distal renal tubular acidosis. That deletion of $\beta 1$ integrin from the intercalated cells also led to distal RTA indicates that polymerized hensin is the critical intermediate in the signaling pathway.

We also measured acid excretion and found that, whereas NH_4 and titratable acid and net acid excretion were not different between the mutant mice and their wild-type littermates, the urine pH of mutant mice was significantly higher than the wild type. Studies in patients with distal RTA (14) usually show that the NH_4 excretion is lower in these patients; however, where documented, these patients had significant renal failure largely attributed to nephrocalcinosis (figures 6 and 7 in ref. 14). When studies were conducted in patients with renal function close to normal there was no difference in these parameters similar to what we found here (figure 11 in ref. 14). Mutant mice had normal glomerular filtration rates.

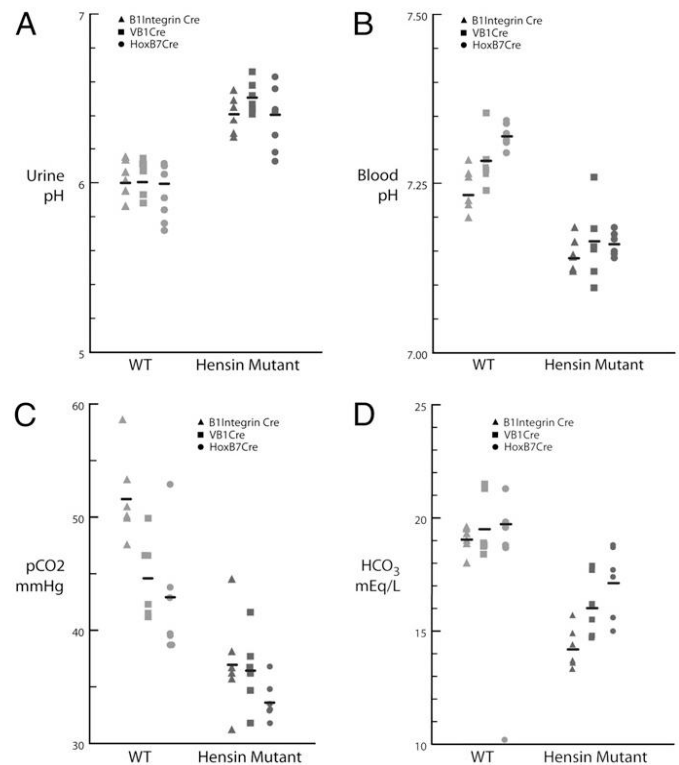


Fig. 1. Acid-base parameters in all three lines of hensin-deleted mice compared with their wild-type littermates. Each time point represents data from a single mouse. Mice were placed in a metabolic cage for 24 h and given water and food ad libitum. Urine was collected under oil and blood was drawn using intracardiac puncture and measured. Wild-type mice were littermates of the mutants. Bar represents average value. The panels show the results of studies of (A) urine pH; (B) plasma pH; (C) blood pCO_2 ; and (D) plasma HCO_3^- concentration in the three lines of mutant mice, each of which is identified with a different symbol and compared to their nonmutant littermates.

Because hensin is expressed by both principal and intercalated cells, it is possible that the “acid signal” that leads to the increased abundance of the α -intercalated cell phenotype is received by the principal cells and transmitted through hensin to the intercalated cell in a “juxtacrine” manner. To test this possibility, we bred the hensin loxP mice to those expressing Cre under the control of the Hoxb7 promoter, which should result in hensin deletion in all cells derived from the ureteric bud (15). The results were quite similar to those in the mice lacking hensin only in the intercalated cells (Fig. 1, HoxB7Cre). These studies demonstrate that the mechanism of action of hensin is “cell autonomous” i.e., acidosis does not stimulate the principal cells to secrete functional hensin molecules, which then alters intercalated cell response to acidosis in a hensin-dependent manner or that the main site of hensin production is in intercalated cells, as suggested by the PCR data on the different mice strains.

Many syndromes of distal RTA are associated with hearing loss, in part because both intercalated cells and cochlea cells express the same transport proteins, such as the B1 subunit of the V-ATPase (16) and a critical transcription factor foxl1 (17). We studied wild-type mice and the VB1 hensin mutant mice by measuring the whole auditory nerve response (known as the compound action potential, CAP) to tones over a range of frequency from 0.2 to 40 kHz. By monitoring the sound level required to elicit a criterion “threshold” response, a CAP threshold tuning curve was constructed, with tone frequency on the horizontal axis, and the threshold sound level on the vertical axis (SI Text, Hearing Tests, and Figs. S4 and S5). There was no difference in these curves between wild-type and mutant mice.

Intercalated Cells in Hensin-Deleted Mice. We quantified the number and subtypes of intercalated cells in the cortical- and medullary collecting tubules using double immunofluorescence staining for aquaporin 2, a marker for principal cells and the B1 subunit of the V-ATPase for the intercalated cells. More than 5,000 cells were counted in the cortical collecting tubule and an equal number in the medulla in each line of mice. In wild-type mice, intercalated cells represented 39% of collecting duct cells in the cortex and 38% in the medulla. In mice deleted for hensin in the entire collecting duct, the fraction of intercalated cells was identical to the wild type, 38% in the cortex and 39% in the medulla. Hence, deletion of hensin did not reduce the number of intercalated cells in the kidney.

Intercalated cells exist in many forms and for the sake of simplicity, we will assume here that there are two “canonical” versions: α -intercalated cells with apical V-ATPase and a basolateral anion exchanger, which is an alternately spliced product of the erythrocyte AE1 gene, and β -intercalated cells with apical pendrin and basolateral (or bipolar) V-ATPase (Fig. 2, wild type). We estimated the expression of AE1 and pendrin in mutant kidney cortex using quantitative PCR in the *Hoxb7Cre:Hensin LoxP* mice and found that AE1 expression in the kidney cortex was reduced to below 4% of WT levels, whereas that of pendrin was increased to 1.37-fold of the WT levels ($n = 2$). Similarly a quantitative Western blot of pendrin showed that mutant mice had 1.34-fold ($n = 2$) the amount of pendrin protein using laminin as a loading control (Fig. S6). Because the number of β -intercalated cells was 2.5-fold that of the WT, pendrin expression per cell must have been reduced. The most likely explanation is acidosis, which all mutant mice exhibited and is well known to reduce pendrin activity presumably due to reduced expression in identified β -intercalated cells (18). We next evaluated the number of α - and β -intercalated cells in wild-type and knockout mice. Intercalated cells were defined as those cells that stained for the B1 subunit of the V-ATPase; α -intercalated cells were defined as those that also had AE1 staining, whereas β -intercalated cells had pendrin staining. In the cortex of wild-type mice, we counted 6,293 cells from four different animals and the results are displayed as blue bars in Fig. 3. Thirty-two percent of intercalated cells stained for pendrin, whereas 68% of cells had AE1 staining. In the medulla we counted 2,017 cells and found no pendrin-positive intercalated cells. In the medulla of wild-type mice almost all of the intercalated cells (99.6%) were AE1 positive, as expected from previous data. In the collecting duct-specific (*HoxB7 Cre:HensinLoxP*) mutant mice the results were dramatically different: we counted 8,662 cells (red

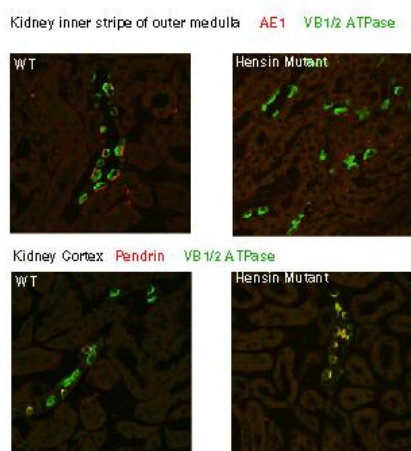


Fig. 2. Immunofluorescence confocal images from the kidney of wild-type and hensin-deleted mice. Merged images are shown where antibodies to AE1 or pendrin (both in red) were simultaneously used with those against the VB1 ATPase. Kidneys were perfused and fixed and then subjected to immunofluorescence and confocal microscopy. Sections represent those from outer medulla and inner cortex. Note that in the mutant mice the antibody to AE1 stained the red blood cells remaining after perfusion.

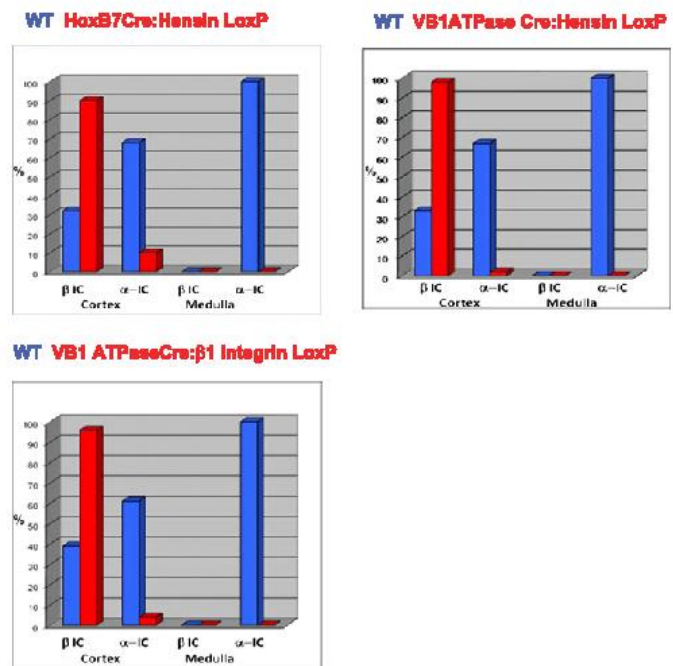


Fig. 3. Quantitative analysis of the number of α - and β -intercalated cells in the cortex and medulla of kidneys taken from wild-type and the three lines of hensin mutant mice. Each panel was derived from three wild-type and three mutant mice. Wild-type mice were littermates of the mutants hence they were actually *HoxB7Cre* or *VB1Cre* rather than true wild-type mice.

bars in Fig. 3). Most (88%) of the intercalated cells in the cortex were pendrin positive. As in the wild-type mice there were no pendrin-positive intercalated cells in the medulla. However, there were few AE1 positive cells (9%) in the cortex (Fig. S7 also shows images taken from cortical labyrinth containing connecting tubules) and none in the medulla (0%). We do not know at present whether the 9% presence of AE1 in the cortex is due to variable penetrance of Cre expression in the cortex as compared with the medulla. We performed similar studies in mice that were deleted in hensin only in the intercalated cells using the ATPase B1Cre mice. As in the total collecting duct knockout animals, these mice had very few AE1-expressing cells in the cortex; wild-type mice had 1,656 AE1-positive cells out of 2,471 total intercalated cells (67%), whereas the hensin KO had only 49 AE1-positive cells out of 2,404 intercalated cells counted (2%). Note that in the knockout mice the antibody to AE1 was functional as seen in staining of the few red blood cells that remain after perfusion of the kidney before fixation (Fig. 2, Upper Right). In the medulla the effect was also dramatic, reducing the α -intercalated cell count (identified by AE1 staining) from 1,209/1,210; 100% to 0/1,209; 0%. Pendrin-expressing cells represented 794/2,406 or 33% of the intercalated cells of the cortex of wild-type mice, whereas in the knockout animals they were 2,371/2,419; 98%. There were no medullary pendrin positive cells in either group of mice. Fig. 2 presents representative images from the kidneys from wild-type or mutant mice stained for pendrin or AE1 and the B1 subunit of the V-ATPase. In summary, these results show that hensin is required for the generation of the α -intercalated cell phenotype in cortical collecting ducts, providing strong support of our hypothesis that during acidosis, β -intercalated cells can convert to α -intercalated cells in a hensin-dependent manner.

β 1 Integrin Is Critical for Hensin Function. Hensin is secreted as a monomer but under the influence of acidosis (in vivo, ref. 7) or high-density seeding in vitro (11), it polymerizes and deposits in the ECM. It is only the ECM form of hensin that functions in conversion of polarity. Polymerization and deposition of hensin is a complex process that requires the secretion of two additional

proteins, cyclophilin A through its *cis trans* prolyl isomerase activity (19, 20) and galectin 3 (21, 22). We had recently shown that the initial event in the polymerization of hensin is the “activation” of $\beta 1$ integrin (11). Blocking antibodies to $\beta 1$ integrin prevented the conversion of cell types in the intercalated cell line and an activating antibody to $\beta 1$ integrin reproduced the phenotype of the α -intercalated cell without any additional requirement. To examine whether deletion of $\beta 1$ integrin in the intercalated cell *in vivo* produces the same syndrome as that of deletion of hensin described above, we crossed the VB1Cre mice with transgenic mice that had LoxP surrounding the $\beta 1$ integrin locus. Remarkably these mice have the same physiology as the conditional hensin knockout mice. They developed distal renal tubular acidosis and their urine pH was higher than their wild-type littermates (Fig. 1). When we examined the distribution of intercalated cells in cortex and medulla, we again found that the cortical collecting tubule contains almost no α -intercalated cells and most of the cells had apical pendrin (Fig. 3). Similarly, the medullary collecting tubule had intercalated cells with diffuse distribution of the V-ATPase but no expression of kAE1 or pendrin.

Ultrastructure of the Intercalated Cells. The medullary collecting ducts of wild-type mice, VB1-, and Hox B7-hensin-deleted mice were examined by electron microscopy to determine the ultrastructural appearance of intercalated cells in this region. In wild-type mice, most intercalated cells had an appearance typical of α -intercalated cells. They contained variable numbers of cytoplasmic vesicles that were restricted to the subapical pole of the cell, as well as well-defined apical microvillar extensions that also varied in number among individual cells. Very few vesicles were seen in the basolateral pole of these cells in wild-type mice (Fig. 4A). In striking contrast, most of the medullary intercalated cells in VB1-hensin knockout mice had the appearance of β -intercalated cells. They had very few if any apical microvillar projections and the entire cytoplasm from the subapical to the basolateral pole was filled with large numbers of vesicles (Fig. 4B). In the outer stripe, toward the cortex, a minority of intercalated cells had the appearance of α -intercalated cells, but these were rare. The intercalated cells in the medullary collecting ducts of HoxB7 mice also looked mostly “nonspecialized” with few apical villi and numerous cytoplasmic vesicles (Fig. 4C). However, whereas the intercalated cells in these mice also had vesicles distributed in the cytoplasm from apex to base, the number of vesicles was lower than in cells from the VB1-hensin deleted mice. Again, a few cells with the typical appearance of α -intercalated cells were seen, but these were in the minority. However, stud-like projections previously identified as proton pumps (23) were found on vesicles and regions of the plasma membrane in cells from both wild-type and knockout mice (Fig. 4B, small *Inset*), supporting the fluorescence studies that the V-ATPase is still expressed in these cells.

Expression of Other Anion Exchangers. A number of other anion exchangers are expressed in the kidney and we examined their expression in the kidney to determine whether any of them was up-regulated in the mice deleted for hensin. As seen in Fig. S8 the expression of AE2 (Slc4a2), AE3 (Slc4a3), AE4 (Slc4a9), Slc26a7, and Slc26a11 did not differ between wild-type and mutant mice. Furthermore, the expression of the transcription factor Foxi1, a gene critical for intercalated cell development, was also not affected by the mutation.

Discussion

Previous studies have shown that substantial conversion of β - to α -intercalated cells can occur after only 3 h of exposure to an acid basolateral medium, a process that was blocked by protein, DNA, and RNA synthesis inhibitors and hence is likely due to induction of new genes (7). However both cell types can respond to a variety of stimuli within a few minutes of exposure to the stimulus. For instance, the α -intercalated cell responds to an increase in the pCO_2 by exocytosis of H^+ ATPase containing vesicles (24). Similarly, cAMP causes redistribution of the ATPase to the apical surface and increases the length of the apical microvilli (25). Fur-

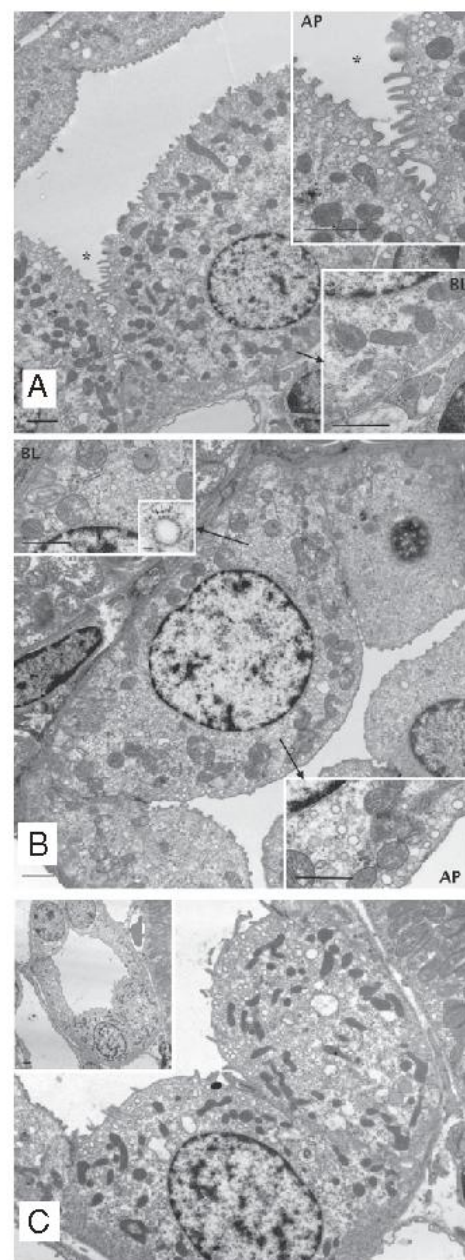


Fig. 4. Ultrastructural studies of Intercalated cells in mouse kidneys. (A) EM of collecting duct from inner stripe of outer medulla of a wild-type mouse kidney. Intercalated cells show typical, well-developed apical microvilli with numerous subapical vesicles. Higher magnification of the apical region (AP) indicated by an asterisk shows these apical vesicles lying beneath the apical pole of this A-type intercalated cell. In contrast, very few vesicles are seen in the basolateral region (BL) of the cell indicated by an arrow, as shown in the *Inset, Bottom Right*. (Scale bar, all panels, 1 μm .) (B) EM of collecting duct from the inner stripe of the outer medulla of a VB1 hensin-deficient transgenic mouse. Many intercalated cells in the medullary region of these animals showed features more typically associated with β -intercalated cells. The detailed *Insets* show that these ICs had few apical microvilli and numerous cytoplasmic vesicles that were located at both the apical (AP) and basolateral (BL) poles. The cytoplasmic vesicles did retain the typical stud-like coat of projections characteristic of the V-ATPase, however (small *Inset, Upper Left*). (Scale bar, 1 μm .) (Small *Inset*, scale bar, 50 nm.) (C) EM of collecting duct from the inner stripe of the outer medulla of a Hox B7 hensin-deficient transgenic mouse. The two intercalated cells shown here have fewer apical microvilli than wild-type cells, and the vesicles typical of ICs are more widely scattered throughout the cytoplasm, some coming close to the basolateral plasma membrane. The *Inset* shows a lower magnification image of the entire tubule containing these cells. (Scale bar, 1 μm .)

ther, isoproterenol by increasing cAMP in the β -intercalated cell stimulated apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3$ exchange (26). The complexity of regulation of acid/base transport is highlighted by these short-term and the hensin-mediated long-term changes described in this paper.

The data presented here demonstrate that deletion of hensin leads to accumulation of β -intercalated and lack of α -intercalated cells indicating that there is a path of differentiation in which the β -cell is less differentiated than the α -type. However this scheme seems to apply only to the cortex, suggesting that medullary α -intercalated cells appear to be derived from a different type of cell, which, unlike β -intercalated cells, does not express pendrin. These cells remaining in the medulla in hensin-deleted mice represent a previously unidentified type of renal cell whose ultrastructure resembles that of β -intercalated cells in that they do not protrude into the lumen and do not have large numbers of cytoplasmic vesicles in their apical pole. However, these cells, as illustrated in Fig. 4 B and C, also differ notably from β -intercalated cell because in addition to not expressing pendrin, they lack some of their morphological features such as dense and clustered mitochondria, an eccentric nucleus, darkly stained cytoplasm, and a vesicle-free apical band. Rather we propose that they are progenitors of the medullary α -intercalated cell. It is known that cortical α -intercalated cells differ from those in the medulla at least with respect to their lectin binding (27). However, the function of those "new" cell types in the mutant mice in acid-base transport is unknown, except that they cannot secrete protons because they lack basolateral AE1, although they express the V-ATPase in an albeit diffuse distribution.

Development of medullary intercalated cells begins early during nephrogenesis where cells expressing V-ATPase and AE1 begin to appear by E15.5 (28). Similarly, pendrin-expressing intercalated cells appear in the connecting tubule as early as E14, but appear in the cortical collecting tubule only after birth (29). In medullary collecting tubules, pendrin-positive cells appear during embryonic development but are eliminated after birth by apoptosis. However, we note that the cortex unlike the medulla develops slowly during embryonic life and its rapid growth is only achieved after birth (30). Hence the differentiation and development of the cells of the cortical and medullary segments occurs in widely differing environments. Because both cortical and medullary intercalated cells are absent from Foxi1 knockout mice (17) a likely first differentiation step would be to specify an intercalated cell fate different from the adjacent principal cell. This is followed by a bifurcation to form two (or perhaps more) lineages, one that would lead to the formation of the β -lineage in the cortex and the other to the "new" cell type uncovered by our study in the medulla. Both cortical and medullary lineages ultimately result in formation of α -intercalated cells, which is the more differentiated and proposed terminally differentiated phenotype in the intercalated cell lineage.

The concept of terminal differentiation implies that once a cell reaches that phenotype its fate is fixed as it becomes "postmitotic." However, there is now an extensive literature especially during embryonic development where a terminally differentiated cell could readily convert to a different phenotype, often another differentiated phenotype even one from a completely different lineage including epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions. These transitions are now known to occur even in mature tissues. Hence an alternative view would be that both α - and β -intercalated cells are in different states of differentiation with their acidosis-dependent conversion being a shift from one differentiated state to another. Recent studies show that HCO_3 treatment leads to a beginning of conversion of α - to β -intercalated cells (31). Whether that process is also hensin dependent, i.e., requiring hensin degradation, is unknown at present.

The mechanism by which hensin mediates its effect on differentiation is unknown. In particular, we do not know that polymerized hensin by itself acts as a ligand for a receptor that transduces the signal from the outside to the nucleus. Recently we found that blockade of $\alpha 6$ integrin prevents the function of polymerized hensin. This might be interpreted as a result favoring the role of this integrin as a signaling receptor for hensin. However, it is possible that polymerized hensin binds to a small molecule and modulates its affinity

for its receptor and that the role of the $\alpha 6$ integrin is to bring it closer to the cognate receptor of the putative small molecule. Many growth factors need to bind to extracellular matrix molecules, which changes their affinity to their receptors (32). Future studies will have to distinguish between these possibilities.

Distal Renal Tubular Acidosis Likely Due to Continuous HCO_3 Secretion. Similar to all other types of complete dRTA the hensin-deficient animals are acidotic and cannot maximally acidify the urine. Defects in net H^+ secretion are the defining characteristics of dRTA either due to defects in basolateral anion exchange, active proton pumping into the tubule, or increased back-leak of H^+ , all reflecting deficiencies of α -intercalated cell function. In such animals or patients, their acidosis will result in conversion of most cortical β -intercalated cells into α -intercalated cells, albeit ones that are incapable of pumping protons. Hence, there will be no HCO_3 secretion in the cortical collecting tubule. The evidence for this is shown in the studies of Walsh et al. who found that furosemide did not change the urine pH significantly (33). Had there been functional β -intercalated cells, one would have expected that the excess delivery of Cl to the cortical collecting tubule would have resulted in increased HCO_3 secretion via pendrin. This scenario can be contrasted with that of the hensin knockout mice where almost all intercalated cells have the apical $\text{Cl}:\text{HCO}_3$ exchanger pendrin despite the presence of significant metabolic acidosis. The lack of hensin prevented these cells from converting to the α -phenotype. Continued HCO_3 secretion explains the appearance of significant spontaneous metabolic acidosis. In other forms of distal RTA, spontaneous acidosis is often absent or mild. This is likely due to the presence of other robust H^+ transporting activities in inner medullary collecting tubule or elsewhere in the nephron where there are no intercalated cells. Whether human syndromes of hensin deficiency exist will require direct tests in families with distal RTA.

Materials and Methods

Transgenic Mice. Hensin LoxP Mice. We constructed the targeting vector using a C57Black6 BAC clone from which we subcloned an ~11.1-kb region. The region was designed such that the short homology arm (SA) extends 1.5 kb 3' to exon 1. The long homology arm (LA) starting at the 5' side of exon 1 is ~9.2 kb long. The single loxP site was inserted upstream of exon 1, and the loxP-flanked Neo cassette is inserted downstream of exon 1. The target region is about 1.9 kb including exon 1. The targeting vector was confirmed by restriction analysis and sequencing after each modification step. A pGKNeo cassette flanked by loxP sites was inserted into the gene. After linearization it was electroporated into C57Black6 embryonic stem cells (InGenious Targeting Laboratory). After selection in G418, surviving clones were expanded for PCR analysis to identify recombinant ES clones. Of these ES clones, 375 proved to be positive. The loxP-containing clone would give a positive PCR signal at 1.6 kb. Seven clones were expanded for microinjection into blastocysts. After the sixth blastocyst injection, new chimeras were born yielding a litter that had transmitted the transgene. These mice, which are C57Black6/J, were then bred with the same or other strains of mice as described below. All animal studies have been performed under protocols approved by the Columbia University Animal Care Facility.

Hensin Deletion Mutants. We generated two lines of mice that were deleted in hensin: one in the entire collecting duct and the other in the intercalated cells only. The loxPhensin mice were of the C57Black6 strain, which were then crossed with HoxB7-Cre to delete hensin from the ureteric bud lineage, which was on the FVB/NJ strain (15). Homozygous hensin^{-/-} mice in the HoxB7 background were born in Mendelian ratios and were fertile and survived until adulthood without any apparent phenotype. The mice were backcrossed to the C57Black6/J strain and all studies were performed on the progeny after a minimum of four generations. To delete hensin in the intercalated cells we used mice expressing Cre under the control of the B1 subunit of the V-ATPase. These mice were in a C57Black6/CBA strain (12). The mice were also viable and fertile and appeared to have no obvious phenotype. All studies reported here were performed after a minimum of three backcrosses to the parental C57Black6 strain. A third line of mice was generated using a $\beta 1$ integrin loxP line (C57Black6;129-Itgb1tm1Efu) obtained from The Jackson Laboratory). This strain was crossed with the B1 ATPase Cre described above and all studies were done after three backcrosses. The screening and genotyping strategy is shown in Fig. S1.

The rest of the methods used in this paper have been previously reported in detail from our combined laboratories and are presented in the *SI Materials and Methods*. These include analysis and collection of blood and urine, Western blot, kidney perfusion, tissue fixation, immunofluorescence confocal microscopy, and electron microscopy.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to Ombeline de La Rochefoucauld, Wei Dong, and Elizabeth S. Olson for performance of the studies on auditory nerve responses, which are described in the *SI Text*. X.G. and Q.A.-A. are

supported by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (20999) and the American Heart Association; D.E. was funded by the Fondation Leducq, and by Grant PHYSIO 2007-RPV07084 from l'Agence Nationale de la Recherche; D.B. is supported by National Institutes of Health (R37 DK42956). T.G.P. is supported by DK-73266. D.E. is additionally supported for his work in the Microscopy Core of the Massachusetts General Hospital (MGH) Program in Membrane Biology by grants from the Boston Area Diabetes and Endocrinology Center (DK-57521) and by the MGH Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease (DK-43341). C.M.-J. is a recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU AP2007-02223).

- Schwartz GJ, Barasch J, Al-Awqati Q (1985) Plasticity of functional epithelial polarity. *Nature* 318:368–371.
- Brown D, Hirsch S, Gluck S (1988) An H⁺-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature* 331:622–624.
- Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HF, Brown D (1989) Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5429–5433.
- Wall SM (2005) Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:480–484.
- Bastani B, Purcell H, Hemken P, Trigg D, Gluck S (1991) Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat. *J Clin Invest* 88:126–136.
- Sabolić I, Brown D, Gluck SL, Alper SL (1997) Regulation of AE1 anion exchanger and H⁺-ATPase in rat cortex by acute metabolic acidosis and alkalosis. *Kidney Int* 51:125–137.
- Schwartz GJ, et al. (2002) Acid incubation reverses the polarity of intercalated cell transporters, an effect mediated by hensin. *J Clin Invest* 109:89–99.
- van Adelsberg J, Edwards JC, Takito J, Kiss B, Al-Awqati Q (1994) An induced extracellular matrix protein reverses the polarity of band 3 in intercalated epithelial cells. *Cell* 76:1053–1061.
- Takito J, Hikita C, Al-Awqati Q (1996) Hensin, a new collecting duct protein involved in the in vitro plasticity of intercalated cell polarity. *J Clin Invest* 98:2324–2331.
- Vijayakumar S, Takito J, Gao X, Schwartz GJ, Al-Awqati Q (2006) Differentiation of columnar epithelia: The hensin pathway. *J Cell Sci* 119:4797–4801.
- Vijayakumar S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al-Awqati Q (2008) Role of integrins in the assembly and function of hensin in intercalated cells. *J Am Soc Nephrol* 19:1079–1091.
- Miller RL, et al. (2009) The V-ATPase B1-subunit promoter drives expression of Cre-recombinase in intercalated cells of the kidney. *Kidney Int* 75:626–633.
- Rubera I, et al. (2003) Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J Clin Invest* 112:554–565.
- Wrong O, Davies HE (1959) The excretion of acid in renal disease. *Q J Med* 28:259–313.
- Zhao H, et al. (2004) Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud. *Dev Biol* 276:403–415.
- Stanković KM, Brown D, Alper SL, Adams JC (1997) Localization of pH regulating proteins H⁺-ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 114:21–34.
- Blomqvist SR, et al. (2004) Distal renal tubular acidosis in mice that lack the forkhead transcription factor Foxo1. *J Clin Invest* 113:1560–1570.
- Petrovic S, Wang Z, Ma L, Soleimani M (2003) Regulation of the apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in rat cortical collecting duct in metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F103–F112.
- Watanabe S, et al. (2005) Cyclosporin A produces distal renal tubular acidosis by blocking peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F40–F47.
- Peng H, et al. (2009) Secreted cyclophilin A, a peptidylprolyl cis-trans isomerase, mediates matrix assembly of hensin, a protein implicated in epithelial differentiation. *J Biol Chem* 284:6465–6475.
- Hikita C, et al. (2000) Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol* 151:1235–1246.
- Schwaderer AL, Vijayakumar S, Al-Awqati Q, Schwartz GJ (2006) Galectin-3 expression is induced in renal beta-intercalated cells during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F148–F158.
- Brown D, Gluck S, Hartwig J (1987) Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H⁺-ATPase. *J Cell Biol* 105:1637–1648.
- Gluck S, Cannon C, Al-Awqati Q (1982) Exocytosis regulates H⁺ transport in the turtle bladder by rapid insertion of H⁺ pumps into the luminal membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4327–4331.
- Păunescu TG, et al. (2010) cAMP stimulates apical V-ATPase accumulation, microvillar elongation, and proton extrusion in kidney collecting duct A-intercalated cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F643–F654.
- Hayashi M, Yamaji Y, Iyori M, Kitajima W, Saruta T (1991) Effect of isoproterenol on intracellular pH of the intercalated cells in the rabbit cortical collecting ducts. *J Clin Invest* 87:1153–1157.
- Brown D, Roth J, Orci L (1985) Lectin-gold cytochemistry reveals intercalated cell heterogeneity along rat kidney collecting ducts. *Am J Physiol* 248:C348–C356.
- Jouret F, et al. (2005) Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H⁺-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 16:3235–3246.
- Song HK, et al. (2007) Origin and fate of pendrin-positive intercalated cells in developing mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 18:2672–2682.
- Cebrián C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA (2004) Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn* 231:601–608.
- Purkerson JM, Tsuruoka S, Suter Z, Nakamori A, Schwartz GJ (2010) Recovery from acidosis: Changes in anion exchanger distribution and expression are major components of reversible adaptation to metabolic acidosis in the cortical collecting duct. *Kidney Int* 78:993–1005.
- Aszódi A, Legate KR, Nakhchbandi I, Fässler R (2006) What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:591–621.
- Walsh SB, Shirley DG, Wrong OM, Unwin RJ (2007) Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: An alternative to ammonium chloride. *Kidney Int* 71:1310–1316.

Capítol IV

S4D-SRCRB, a soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich superfamily is a dual-specific pattern recognition receptor for self and non-self structures

Cristina Miró-Julià^{*}, Sandra Roselló[†], Olga Padilla[†], José Yelamos J[¶], Jordi Vila[‡],
Francisco Lozano^{*†**}.

* Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. † Servei d'Immunologia and ‡ Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ¶ Servei d'Immunologia, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Hospital del Mar, Barcelona, Spain. ** Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Barcelona, Spain.

Resum. El present estudi analitza les característiques estructurals i funcionals d'un membre soluble de la superfamília de receptors *scavenger* rics en cisteïna (SRCR-SF) previament identificat pel nostre grup, S4D-SRCRB, que està format per quatre dominis SRCR del grup B separats per seqüències riques en prolina, serina i treonina (PST) susceptibles d'esser O-glicosilades. L'anàlisi per Northern blot indicava que S4D-SRCRB s'expressa com dues espècies d'ARN missatger: una de 2.8 kb, amb un patró d'expressió tissular restringit (expressat principalment en el ronyó, la placenta i en la línia cel·lular anomenada HepG2), i l'altra de 1.5 kb, amb una àmplia distribució. Per tal d'aprofundir en la funcionalitat de la molècula, es va produir una forma recombinant de la proteïna marcada amb una cua d'hemaglutinina (HA) (rhS4D-HA) emprant un sistema d'expressió episomal (pCEP-PU) en cèl·lules HEK 293-EBNA. La proteïna rhS4D-HA es va purificar per afinitat a partir dels sobrenedants de cultius mitjançant la cua d'HA i es va emprar per generar anticossos. De la mateixa manera que altres membres de la SRCR-SF (S5D-SRCRB, CD6 i DMBT1), rhS4D-HA s'uneix a la superfície dels bacteris Gram + i Gram- i també de fongs. En la unió de la proteïna als microbis esmentats intervé el reconeixement d'àcid lipoteicoic (LTA) o lipopolisacàrid (LPS), i β -glucans lineals, respectivament. La presència de rhS4D-HA va augmentar la secreció d'IL-8, en exposar cèl·lules HepG2 a compostos de la paret bacteriana. A més, rhS4D-HA també s'uneix a proteïnes de la matriu extracel·lular (fibronectina i laminina). Les capacitats d'unió de S4D-SRCRB suggereixen que aquest és un receptor per estructures endògenes i exògenes, i la seva expressió -restringida a teixits epitelials- indicaria que intervé en la defensa innata i l'homeòstasi de les superfícies epitelials.

Abstract

Human S4D-SRCRB is a soluble member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily (SRCR-SF), which is composed of four group B SRCR domains separated by Pro-, Ser- and Thr-rich sequences suitable for O-glycosylation. Northern blot analysis indicated that S4D-SRCRB is expressed as two major mRNA species: one of 2.8 kb, with a restricted tissue expression pattern (mainly kidney, placenta and the HepG2 cell line), and another of 1.5 kb, with a broader distribution. To gain insight into the function of this molecule, we produced a recombinant form fused to an HA tag (rhS4D-HA) using an episomal expression system (pCep-PU) in HEK 293-EBNA cells. rhS4D-HA was affinity purified from cell culture supernatants by means of its HA tag and used to generate antibodies. Similar to other members of the SRCR-SF (S5D-SRCRB, CD6 and DMBT1), rhS4D-HA binds to the surface of Gram+ and Gram- bacteria and fungi. Microbial binding is mediated through the recognition of lipoteichoic acid (LTA) or lipopolisaccharide (LPS), and lineal β - glucans, respectively. The presence of rhS4D-HA increased the secretion of IL-8, when HepG2 were exposed to bacterial cell wall compounds. Moreover, rhS4D-HA also bound to extracellular matrix proteins (fibronectin and laminin). These binding abilities suggest that S4D-SRCRB is a receptor for self and non-self structures, and its restricted epithelial tissue expression indicates that it might play a role in the innate defense and homeostasis of epithelial surfaces.

Introduction

The SRCR-SF (Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily) is an ancient and highly conserved group of membrane anchored and/or soluble proteins, expressed by hematopoietic and non-hematopoietic cells, at either embryonic or adult developmental stages. Some members have been related to the regulation of both innate and adaptive immune responses and in the development of the immune system (Aruffo 1997, Vilà 2000, V.G Martínez

2012). Members of the SRCR-SF are characterized by the presence of one or more repeats of a cysteine-rich extracellular domain, named SRCR, which is an ancient and highly conserved protein module of ~100-110 amino acid residues containing from 6 to 8 cysteines (Resnick 1994).

Although the SRCR domain presents a high degree of structural and phylogenetic conservation, no common ligand or consensus have been ascribed to the members of the SRCR-SF described to date. However, different data indicate that these proteins could mediate protein-protein interactions and ligand binding (Krieger, M 1994) (Pearson, AM 1996), participate in basic homeostatic functions and some members could play an important role in the innate defense of the host (Sarrias, MR 2005)(Jiang, Y 2005).

Innate immunity represents the first line of host defense against pathogens (bacteria, virus, fungi, etc.) for multicellular organisms. Innate immunity is a group of different inborn defense mechanisms against non-specific antigens that are used as an initial stimulus by the host to eliminate invasive pathogens in immediate responses after exposures to an antigen (immediately after the pathogen detection or within several hours). The role of innate immunity is outstanding because organisms are constantly exposed to exogenous infectious agents. By using receptors that recognize Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), the so called PRRs (Pattern Recognition Receptors) are one of the host's most effective mechanisms to sense exogenous compounds and start a response against them.

In recent years, a number of new PRRs have been described, a few of them belonging to the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily (SRCR-SF). The SRCR-SF is an ancient and highly conserved group of membrane and/or secreted proteins related to the innate and adaptive immune system, defined by the presence of one or several repeats of the SRCR domain, a structurally well-defined and conserved protein module of 100- 110 aa residues. Although no unifying function has been described for SRCR domains, recently a role as

PRRs has emerged as a putative shared property for some members of the group B of the SRCR-SF (CD6, CD5, Sp α , CD163 and DMBT1/gp340/Salivary-agglutinin). It has been proposed that SRCR domains have been selected through evolution as a domain that allowed the appearance of several new proteins with different recognition and/or binding abilities. This may be the case for the human S4D-SRCRB receptor, a new soluble member of the group B SRCR-SF previously identified by our group (O. Padilla 2000). The mRNA expression pattern of S4D-SRCRB reveals that it is mainly expressed in epithelia, thus suggesting that this protein could be involved in innate defense and/or basic homeostatic functions of these relevant structures.

In the present work, we report biochemical characterization of the S4D-SRCRB protein and its binding abilities, as well as its expression profile and potential activity promoting inflammation in epithelia. These data argue in favor of human S4D-SRCRB being a component of the humoral arm of the innate immune system likely involved in the defense and homeostasis of host epithelial surfaces.

Material and methods

Cell lines

The Human Embryonic Kidney epithelial cell line HEK 293-EBNA (Invitrogen) was grown in DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 100 U/mL of penicillin, 100 ug/mL of streptomycin, 250 ug/mL of geneticin (G418) and 10% FCS (complete medium). DMEM/F12, FCS, geneticin, penicillin, and streptomycin were purchased from Life Technologies. FCS was heat inactivated for 30 minutes at 56°C before use. During protein purification, cells were grown with serum-free DMEM/F12 medium (serum-free medium).

Expression of a recombinant form of hs4d-srcrb

The cDNA sequence of interest was cloned into the pCEP/Pu mammalian episomal expression vector (Invitrogen) and then transfected into mammalian cells (HEK 293-EBNA cells).

Before final cloning into pCEP/Pu, the full-length cDNA coding for hs4d-srcrb was subcloned into the pHA vector (a modified form of the pUC vector that contains 3 HA tag sequences next to the C-terminal region of the multicloning site). Then, the pHA-S4DSRCRB construct was digested with appropriately restriction enzymes, and the resulting fragment was gel-purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and cloned into appropriately digested pCep/PU vector using the T4 DNA Ligase (TAKARA). The ligation product was transformed into bacterial competent cells and several clones were analyzed by sequencing in both directions with vector-specific primers using the Big Dye Reaction kit (PE Applied Biosystems). The resulting pCEp-S4D construct contained part of the leader sequence of the gene and it was fused with a HA tag at the C-terminal region of the protein.

The constructs generated were transfected into HEK 293-EBNA cells using Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfectants were selected 48 hours after transfection using 1 µg/mL of puromycin (Sigma) and were then grown to confluence in DMEM/FCS. To analyze recombinant protein expression, cells were grown using serum-free media. Supernatants were collected and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions, and electotransferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were blocked for 1 h at RT with PBS containing 10% non-fat milk and then incubated with mouse anti-HA tag antibody (BaBCO), followed by incubation with a solution 1:1000 dilution of anti-Mouse IgG/HRP (Amersham Biosciences) in blocking buffer. Results were visualized by chemiluminescence with Supersignal West Dura Extended Duration Solution (Pierce).

Production and purification of rhS4D

Transfected cells were grown to confluence in complete medium and then the medium was replaced by serum-free medium. Supernatant was collected every

48 hours for two weeks. Elimination of fetal calf serum decreased the viability of cells, but it allowed for a better purification of the recombinant protein contained in the supernatant by affinity chromatography.

Recombinant rhS4D-HA_{tag} was affinity purified from the culture supernatants by means of its HA tag since we did not dispose of specific antibodies. Once monoclonal antibodies were obtained, purifications were carried out using aCNBr-activated Sepharose 4B columns covalently coupled to the monoclonal antibody 5B3-3F3. The column was washed off with PBS containing 0,5M NaCl and 1% NP40 to eliminate the unbound protein and bound protein was then eluted with PBS containing 3,5M MgCl₂. Buffer in fractions of interest was exchanged to PBS using HiTrapTM desalting columns (Amersham Biosciences) and the purified proteins were resolved electrophoretically by SDS-PAGE under reducing conditions. The purity and integrity was determined by silver staining of the gels and by Western blot using an anti-HA biotinylated antibody and a HRP-labelled streptavidin.

Deglycosylation assays

Purified rhS4D-HA (0.5µg) was separated on 6–8% SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions, followed by electrotransfer to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). In parallel, 0.5µg of purified rhS4D-HA were also treated with different glycosidase combinations from the Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (cat. # EDEGLY-1KT, Sigma), following the manufacturer's instructions. The resulting products were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot, as described above.

For Western blot analysis, membranes were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing 5% non-fat milk and then incubated with a mouse anti-S4D-SRCRB mAb (cat. #H00136853-M01, Abnova). After extensive washing with PBS 0.01% Tween20, membranes were further incubated with a 1:1000 dilution (in blocking buffer) of HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG (Amersham Biosciences). Blots were visualized by chemiluminescence with Supersignal West Dura Extended Duration Solution (Pierce).

ELISA assays

Interaction of rhS4D-HA with PAMPs was analyzed by coating 96-well microtiter plates (Nunc) overnight at 4°C with 2 µg/well of purified LPS from *E. coli* K12 (InvivoGen), PGN (cat. #77140; Sigma) and LTA from *S. aureus* (cat. # 2515; Sigma), Chitin from crab shells (cat. # C9213, Sigma), Zymosan A from *S. cerevisiae* (cat. #z4250; Sigma), b(1→3)-glucan from *E. gacilis* (cat. #89862; Sigma), b-D-glucan from *S. cerevisiae* (cat. #g6513; Sigma), or mannan from *S. cerevisiae* (cat. #m7504; Sigma) in coating buffer (100 mM NaHCO₃ [pH 9.5]). Non-specific binding to plastic wells was prevented by incubation for 1 h at room temperature in blocking solution (PBS plus 3% BSA). Serial 2-fold dilutions of purified rhS4D-HA were added to the wells and incubated for 2 h at room temperature. After extensive washing, bound protein was detected by 1-h incubation at room temperature with rabbit anti-hS4D-SRCRB sera produced in our laboratory, followed by a 30-min incubation with a 1:1000 dilution of HRP-conjugated sheep anti-rabbit or sheep anti-mouse IgG antiserum (Amersham Biosciences). Between each incubation step, excess unbound proteins were washed off three times with PBS 0.01% Tween 20. Color was developed by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate (Sigma), and the absorbance was measured at 450 nm. The assay was repeated twice with similar results.

Interaction of rhS4D-HA with extracellular matrix proteins was analyzed by coating ELISA microtiter plates overnight at 4°C with 0.5 µg/ well purified fibronectin, laminin, collagen I, and collagen IV (supplied by Angeles García-Pardo, Centro de Investigaciones Biológicas-Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) in PBS (Roche). The assay conditions were the same as described above, with the exception that incubations were performed at 4°C. The assay was repeated twice with similar results.

Bacterial- and fungal-protein recognition and aggregation assays

E. coli ATCC25922 and *S. aureus* ATCC29213 were obtained from the American Type Culture Collection. The rest of the bacterial and fungal strains used in this study are clinical isolates characterized by the Department of Microbiology,

Hospital Clinic of Barcelona, using standard biochemical procedures. Bacteria were grown overnight at 37°C in Luria- Bertani medium, and fungi were grown at 28°C in Sabouraud's medium with aeration, harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min, and resuspended in TBS to a final density of 10^{10} bacteria/ml or 10^8 fungi/ml. Quantification was performed by plating bacteria and fungi dilutions on agar. The aggregation assays were performed using fresh overnight cultures of *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *S. aureus*, and *Candida albicans* harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min and then resuspended in PBS to a final density of 10^{10} bacteria or 10^8 fungi per ml. FITC (Sigma) was dissolved in PBS to a concentration of 10 mM and then added to the bacterial/fungal suspensions to a final concentration of 1 mM for 30 min at room temperature. Following removal of excess unbound FITC by extensive washing with PBS, 10 μ l FITC-labeled bacterial/fungal suspension (5×10^7 bacteria and 5×10^6 fungi) in TBS containing 5 mM CaCl_2 was incubated overnight at room temperature with 20 μ g/ml affinity-purified rmS5D-SRCRB-HA or BSA. Then, 10 μ l the samples were examined by fluorescence microscopy.

IL-8-release assay

Confluent monolayers of HepG2 cells on a 96-well plate were incubated in serum-free media for 24 h. Cells were then pulsed with 20 μ g/ml PGN for 24 h in the presence of PBS, 2 μ g/mL (+) or 10 μ g/mL (++) of purified rhS4d-HA in PBS, a dilution 1:100 of mouse anti-S4D-SRCRB mAb (Abnova), and several combinations of these conditions. Culture supernatant samples (25 μ l) were collected and assayed in triplicate by ELISA for human IL-8 (BD OptEIA, Human IL-8 ELISA Set; BD Biosciences, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions.

Results

Biochemical characterization of rhS4D-SRCRB

Afinity purified recombinant rhS4D-HA from culture supernatant of HEK-293-EBNA transfectants was analized by Western Blot under reducing and non-

reducing conditions. Two major bands of about 180kDa were observed under non-reducing conditions in the absence of SDS. Under reducing conditions two major bands of about 115 kDa and another of 85 kDa, respectively. The larger bands observed under native conditions suggest that S4D-SRCRB has the ability to self-aggregate. On the other hand, the MW of S4D-SRCRB observed under reducing conditions was higher than the predicted MW (56 kDa) from the cDNA sequence previously reported. The *in silico* analysis of the predicted amino acid sequence of human S4D-SRCRB reveals the putative presence of multiple O-linked glycosylation sites, most of them located in the Pro-, Ser- and Thr-rich regions, but no N- glycosylation sites. To confirm this, recombinant S4D-SRCRB was treated with different glycosidases, either alone or in combination. S4D-SRCRB was resistant to treatment with N-acetylglucosaminidase and PNGase, but sensitive to Neuraminidase. This indicates that S4D-SRCRB has a high content of sialic acid, which is a typical end-terminal residue decorating O-linked glycosylations. (Fig. 1).

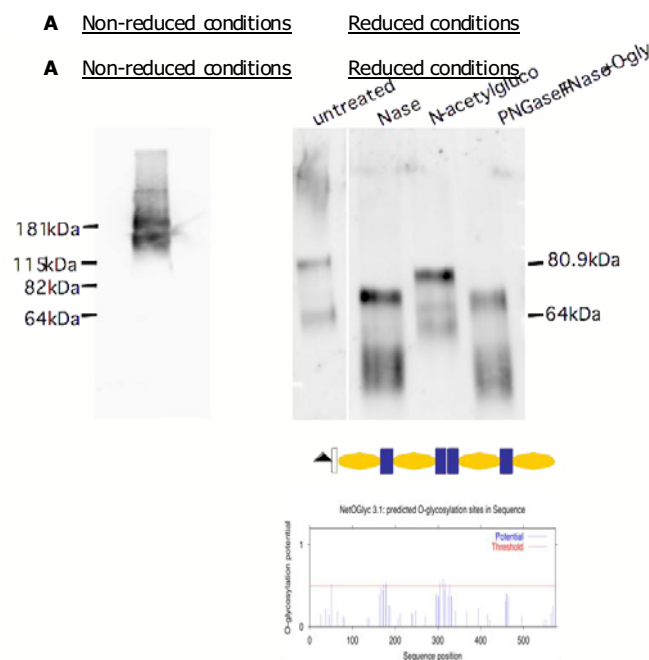


Fig. 1. Biochemical characterization of S4D-SRCRB. **A.** rhS4D-HA-tag analysed in reducing and non-reducing conditions and incubated with glycosidases: Neuraminidase (Nase), β -N-Acetylglucosaminidase (N-acetylgluco), O-glycosidase (O-gly) and PNGaseF. **B.** The predicted amino acid sequence of S4D-SRCRB contains multiple O-linked glycosylation, at the Pro-, Ser- and Thr-rich sequences (blue).

Binding of S4D-SRCRB to non-self and self structures

Studies of binding by ELISA shown that recombinant S4D-SRCRB binds in a

dose-dependent manner to extracellular matrix proteins (Laminin and Fibronectin), as well as to PAMPs from bacteria Gram+ (PGN and LTA), Gram- (LPS) bacteria and fungi (β -glucans, zymosan), as well as parasites/fungi (chitin) (Fig 2).

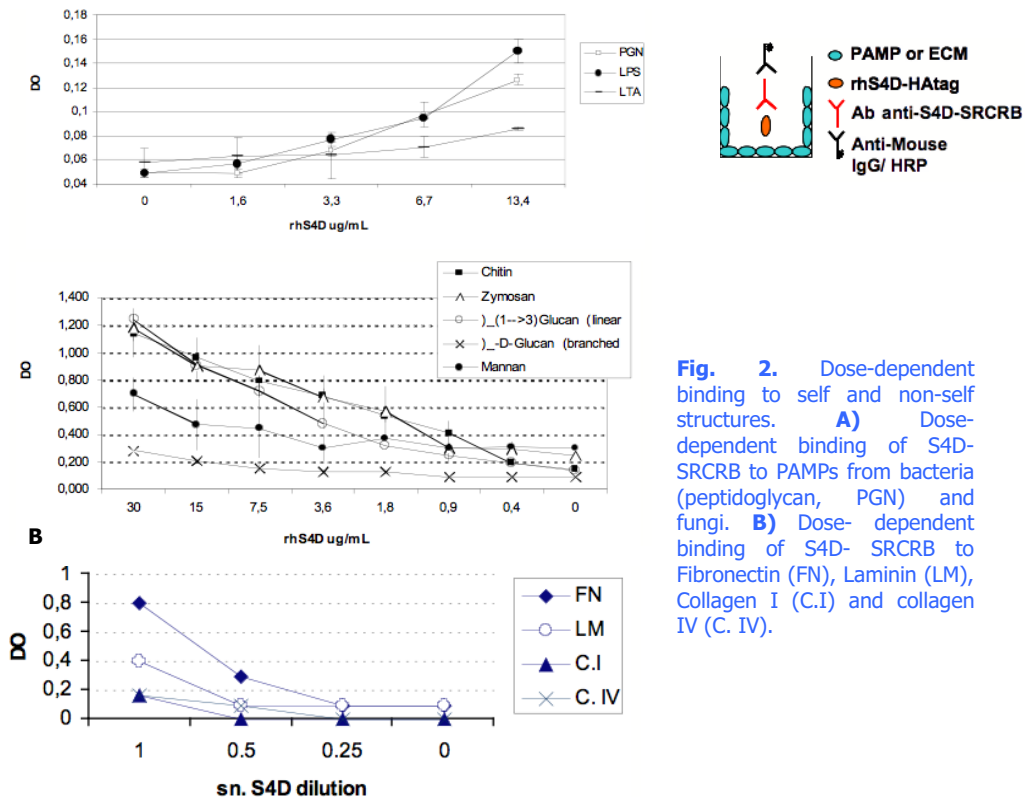


Fig. 2. Dose-dependent binding to self and non-self structures. **A)** Dose-dependent binding of S4D-SRCRB to PAMPs from bacteria (peptidoglycan, PGN) and fungi. **B)** Dose-dependent binding of S4D-SRCRB to Fibronectin (FN), Laminin (LM), Collagen I (C.I) and collagen IV (C. IV).

The presence of bound rhS4D-SRCRB-HA was developed using anti-S4D-SRCRB mouse mAb plus HRP-conjugated anti-mouse IgG antiserum.

rhS4D-SRCRB anti-HA affinity purified protein induces aggregation when incubated with bacterial or fungal cell suspensions, an effective mechanism to avoid dissemination of pathogenic agents and, thus, to control infection. As shown in Fig. 3, addition of rhS4D-SRCRB, but not BSA, to microbial suspensions induced aggregation of Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*, *K. oxytoca*) bacteria, as well as fungi (*C. albicans*).

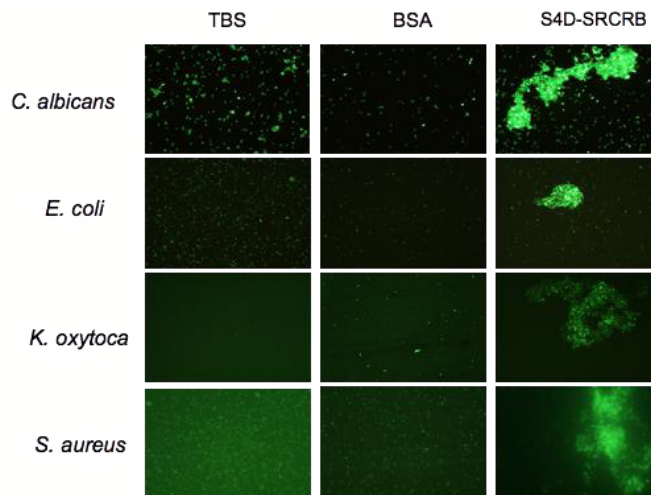


Fig. 3. S4D-SRCRB induces bacterial aggregation. FITC-labeled *E. coli*, *K. oxytoca*, *S. aureus* and *C. albicans* suspensions were incubated overnight at RT with rhS4D-HAtag or BSA in TBS plus 5 mM Ca^{2+} . Aggregation was observed by direct examination on a fluorescence microscope.

S4D-SRCRB increases the PAMP-induced release of IL-8

Since S4D-SRCRB is a secreted protein able to bind to microbes, as well as to some components of the ECM, we tested whether S4D-SRCRB serves as an extracellular modulator of a cell's environment. To demonstrate this we exposed HepG2 cells –which express TLR2– to PGN in the presence or absence of increasing amounts of rhS4D-SRCRB-HA and of saturating amounts of a monoclonal anti-S4D-SRCRB antibody, the latter serving as a dose-dependent blocker of bacterial binding, as shown in Fig 4.A. The experiment revealed the release of IL-8 induced by peptidoglycan was increased by S4D-SRCRB in a dose-dependent manner. Moreover, the presence of the blocking antibody inhibited effect of S4D-SRCRB on IL-8 release.

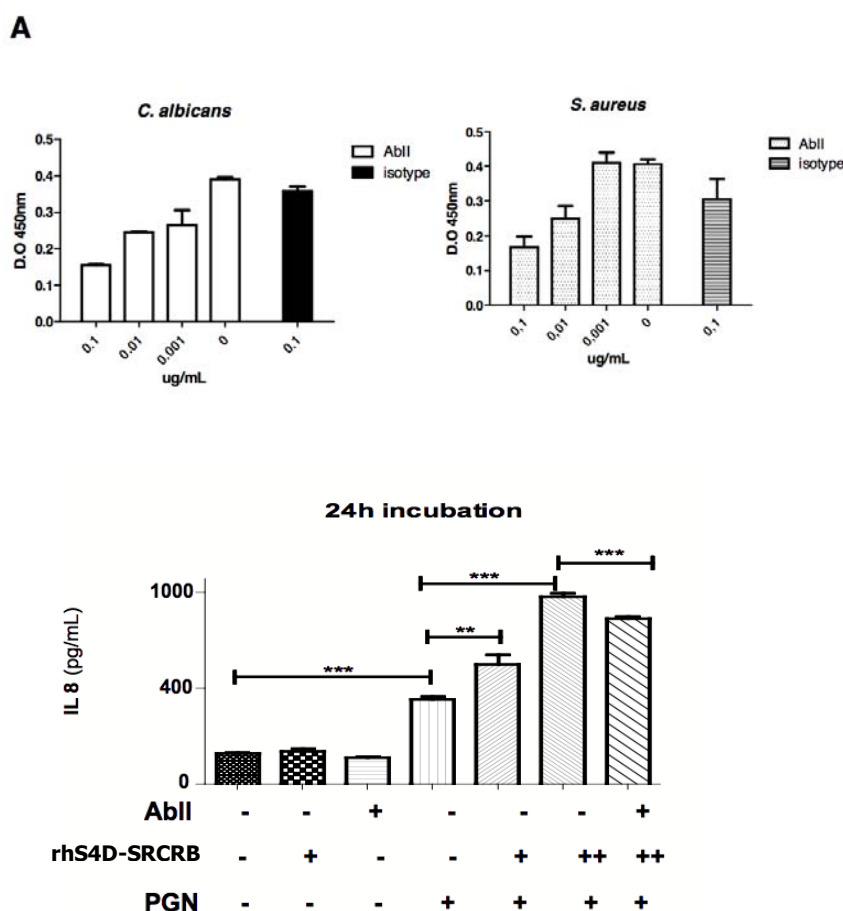


Fig. 4. A, anti-S4D-SRCRB (monoclonal) blocks of bacterial binding of rhS4D-SRCRB- mediated bacterial binding in a dose-dependent manner. **B,** S4D-SRCRB increases the secretion of IL-8 in a dose-dependent manner, when HepG2 are incubated with peptidoglycan (PGN), a bacterial wall compound. The effect is partially inhibited by the presence of an anti-S4D-SRCRB (AbII). *** p <0.001, ** p<0.01. 20 µg/ml PGN for 24 h in the presence of PBS, 2µg/mL (+) or 10µg/mL (++) of purified rhS4d-HA in PBS, a dilution 1:100 of mouse anti-S4D-SRCRB mAb.

Discussion

The present work reports the generation of a recombinant form of hS4D-SRCRB that was successfully expressed using the pCEP-Pu/HEK 293 EBNA system. Using an in-house developed purification process, we purified a secreted protein of approximately 80 kDa. The difference between its predicted molecular mass (60 kDa) and its observed molecular mass (approximately 80 kDa) indicates that this protein is post-translationally modified, very likely due to the presence of O-glycosylation sites in its PST-rich regions. Previous work from our group (O. Padilla 2000) showed that this gene is expressed in several different tissues and cell lines, mainly of epithelial origin.

Recombinant hS4D-SRCRB binds and recognizes cell wall constituents from Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E.coli*) bacteria as well as fungi/parasite in a specific and dose-dependent manner. The bacteria binding ability is shared with other members of the SRCR-SF, such as SR-AI/II (Dunne, 1994), MARCO (Elomaa, 1995) (Brannstrom, 2002), gp-340/DMBT1 (Carlen, 1998), Spa (Sarrias, 2005), SCARA5 (Jiang, 2006) and S5D-SRCRB (C. Miró-Julià 2011). Different studies of the bacterial binding processes determined that SR-AI/II binds to bacteria through its collagenous domain, whereas the binding of MARCO, gp-340/DMBT1, CRP-ductin and Spa is mediated through their SRCR domain. This bacterial binding characteristic could be a common function of some SRCR domains, demonstrating their implication in the innate defense responses of the host.

The bacterial cell wall is a structure which surrounds the cell membrane and it is not identical in all the bacterial strains. Approximately 90% of Gram-positive cell walls is composed by different layers of peptidoglycan (polymer composed of alternating N-acetylglucosamine and N-acetyl-muramic acid) connected by amino acid bridges. Lipoteichoic acid (LTA) molecules, polysaccharides that cross all the peptidoglycan layers and are exposed to the cell surface, can also be found in the cell walls of this type of bacteria.

The Gram-negative cell wall is thinner, so only the 20% of its structure is formed by peptidoglycan polymers. However, the outermost area of the cell wall is equipped with an additional lipopolysaccharide layer, attached to the peptidoglycan layer by lipoproteins. A similar arrangement is observed in the fungal cell wall, in which chitin fibers support the more exposed β -glucans. As previously mentioned, LPS, LTA and β -glucans are located on the cell wall surface and so could act as PAMPs, being recognized by PRRs.

The surface components of pathogens could bind to host extracellular matrix (ECM) components to induce an effective infection, but the ECM components can also participate in innate immunity responses, acting as pattern-recognition molecules for microbial pathogens (You-Wen 2004).

The ECM complex is formed by glycoproteins and proteoglycans and this cellular structure serves as structural support for tissues. It also participates in the responses induced in the cells they interact with, affecting cell adhesion, migration, proliferation and differentiation (Hay, 1991). However, it also serves as a binding site for the colonization and further infection of pathogens in the host. Pathogens can bind to some ECM macromolecules such as fibronectin, collagen, vitronectin and thrombospondin (Patti, 1994) (Westerlund, 1993). The ECM binding studies shown that hS4D-SRCRB is able to bind to fibronectin and laminin, so it is possible that this protein would be immobilized in the extracellular matrix. It would be interesting to carry out further studies to determine the levels of the endogenous hS4D-SRCRB in the extracellular matrix structures, but it is necessary to consider that SRCR-SF members mostly have low expression levels.

hS4D-SRCRB also possesses the ability to agglutinate bacteria and fungi, pointing out the possibility that it may act as an opsonin for further macrophage phagocytosis of the bound pathogens. This binding activity suggests that hS4D-SRCRB acts as a pattern-recognition receptor, being useful in the innate immune defence of the host.

The functions of hS4D-SRCRB are not yet well known but its bacterial and extracellular matrix protein binding capabilities, coupled to its expression on epithelial surfaces may indicate that hS4D-SRCRB could be secreted and be retained by binding to some ECM components. Once a microbial organism invades the site, S4D-SRCRB could enhance IL-8 release and favour innate (and later, adaptive) immune responses.

Discussió

L'objectiu principal de la present tesi ha estat caracteritzar estructuralment i funcionalment nous membres solubles del grup B de la SRCR-SF: mS5D-SRCRB i hS4D-SRCRB (tots dos identificats pel nostre grup).

Una primera dificultat del nostre estudi es que cal recordar que a dia d'avui no es coneix cap funció unificadora pels membres de la SRCR-SF. Una possible explicació a aquest fet, esgrimida per la literatura (Sarrias, Gronlund et al. 2004), proposa que es deu a que el mòdul proteic SRCR combina dues característiques. D'una banda, presentaria una gran estabilitat estructural (mercès d'alguns aa amb un elevat grau de conservació) i, de l'altra, també permetria una relativa variació en els aa més exposats que no intervindrien directament en la conformació del domini SRCR, però sí en la interacció amb els seus lligands.

Així, està ampliament acceptada la idea que la combinació de les dues característiques esmentades hauria afavorit la selecció positiva del domini SRCR per donar lloc a noves proteïnes (que es produeixen per mutació dels aa no essencials per a la seva estructura, així com per repeticions del mateix domini en tandem o per combinacions tipus mosaic amb diferents tipus de dominis proteïcs). Això hauria donat lloc a molts tipus de receptors diferents pertanyents a la mateixa família SRCR però que tindrien diferents propietats i activitats biològiques.

Havent repassat el concepte bàsic que recullen tots els membres de la SRCR-SF, és moment d'analitzar en detall els resultats obtinguts en la tesi per a tres membres solubles del grup B de la SRCR-SF: hS4D- i mS5D-SRCRB, identificats recentment, i DMBT1, un membre clàssic del grup. Primerament, es discutiran les dades estructurals de cada proteïna i, posteriorment, es valorarà el rol biològic de cada una, en funció dels resultats obtinguts al llarg d'aquest treball de tesi. Finalment, un cop descrites les potencialitats dels tres membres del grup B, es realitzarà una comparativa entre ells. Aquesta establirà paral·lelismes i diferències entre les tres proteïnes SRCR, per tal de recollir una interpretació

el més àmplia i contextualitzada possible de la informació, disponible anteriorment i obtinguda al llarg d'aquesta tesi de S4D-SRCRB, S5D-SRCRB i DMBT1.

mS5D-SRCRB i DMBT1 exemplifiquen la formació de proteïnes mosaic, mentre que S4D-SRCRB il·lustra aquelles proteïnes que estan formades únicament per repeticions del domini SRCR, a més d'algunes regions PST que els separen. Addicionalment, DMBT1 és un exemple clar de la capacitat que mostren alguns membres SRCR per reconèixer diferents tipus de lligands i, per extensió, d'intervenir en diversos processos com la defensa innata i la diferenciació cel·lular.

Un primer punt a analitzar, centrant-nos en DMBT1 (homòleg humà de la proteïna de conill hensin), són els estudis realitzats amb ratolins WT (hensinLoxP) i KO específics per DMBT1 en el ronyó (hensinLoxP:HoxB7Cre i hensinLoxP:VB1Cre); aquests estudis van confirmar resultats previs (Vijayakumar, Takito et al. 2006) que apuntaven que l'expressió i polimerització de DMBT1/hensin en l'espai extracel·lular eren crítics en la transició d'un fenotip β -IC a un d' α -IC.

La participació de DMBT1 en processos de diferenciació cel·lular concorda amb anteriors observacions que proposaven a DMBT1 com un gen supressor de tumors (Mollenhauer, Holmskov et al. 1999). En tant que DMBT1 participa de la diferenciació d'alguns tipus cel·lulars (com les cèl·lules intercalades corticals i medul·lars del ronyó), la seva delecció podria afavorir fenòmens de desdiferenciació, els quals poden desencadenar tumorogènesi. En el mateix estudi també es descriu que la participació de l' β 1-integrina és crítica per la polimerització de DMBT1/hensin i per tant en la diferenciació de les IC. Gràcies a aquest treball, queda clar que la polimerització de DMBT1/hensin s'associa a variacions en el pH de la sang. En canvi, la via de senyalització responsable dels canvis en el patró de secreció de Hensin i com la seva polimerització deriva en

una repolarització de la cèl·lula són preguntes que hauran de respondre nous treballs.

En segon lloc, i pel que fa a hS4D- i mS5D-SRCRB, els assajos bioquímics realitzats han permès caracteritzar molecularment els dos membres més nous del grup B de la SRCR-SF: S4D-SRCRB i S5D-SRCRB, dels quals -a l'inici de la present tesi- la literatura n'oferia un coneixement molt limitat (S4D-SRCRB) o inexistent (S5D-SRCRB).

En un treball previ del nostre grup a on es reportava l'identificació i clonació de S4D-SRCRB com a nou membre soluble de la SF-SRCR es va establir que aquest receptor està format per quatre dominis SRCR i seqüències riques en PST. Gràcies als estudis bioquímics aquí realitzats amb una forma recombinant de la proteïna humana S4D-SRCRB fusionada a una cua d'HA i expressada a cèl·lules embrionàries de ronyó humà (HEK293), s'ha descrit que aquestes regions PST concentren totes les glicosilacions que presenta la mateixa proteïna, les quals són exclusivament mitjançant unions tipus O-. Per contra, s'ha observat que S5D-SRCRB està formada per cinc dominis SRCR que poden estar separats per polipèptids PST o per altres regions altament glicosilades (de tipus mucina o *mucin-like*), i amb certa homologia amb un domini tipus sindecà. A més, S5D-SRCR té un patró de glicosilació més complex (conté O- i N-glicosilacions), que no es situa únicament en les regions interdominis i que és relativament prou resistent als tractaments amb glicosidases (comportament típic de proteïnes altament glicosilades, i especialment de les mucines). Tot i que la seqüència protèica dels dominis SRCR de les dos proteïnes guarden una elevada homologia aminoacídica, mS5D- i hS4D-SRCRB presenten diverses diferències estructurals i modificacions post-traduccionals que podrien comportar diferències funcionals notables entre els dos receptors.

Un tercer punt a discutir és el patró d'expressió de S5D-SRCRB. Aquest punt es va poder abordar gràcies a tècniques de PCR a temps real i a la generació d'anticossos monoclonals (i policlonals) específics contra S5D-SRCRB en el

nostre grup de recerca. Així es va observar que S5D-SRCRB presentava un patró d'expressió tissular relativament restringit, sent testicle, ronyó i pàncrees els teixits amb un major nivell d'expressió del gen *s5d-srcrb*. Si bé aquest patró difereix del que presenten molts membres de la SRCR-SF, els quals tenen una expressió estrictament limfoide (SR-A, MARCO, CD6, CD5 i CD163 entre d'altres), no és un cas únic. Tant DMBT1 (membre del grup B de la SRCR-SF) com SCARA5 (grup A) presenten un patró d'expressió extra limfoide.

Un estudi detallat de l'expressió de mS5D-SRCRB al llarg del tracte urogenital murí va permetre determinar que aquesta proteïna s'expressa apicalment en els túbuls col·lectors del ronyó, la papil·la i la pelvis renal, en els urèters, la bufeta urinària, l'uretra i l'epididim. És ben conegut pels nefròlegs (Al-Awqati and Oliver 2006) que en una regió concreta de la pelvis renal se situen les cèl·lules mare adultes del ronyó. Emprant marcadors d'aquestes cèl·lules i anticossos anti-S5D-SRCRB, es va poder determinar que si bé S5D-SRCB no col·localitza amb les cèl·lules mare, en la pelvis, sempre es troba adjacent a aquestes cèl·lules progenitores. Si bé aquest resultat -per si sol- no aporta dades funcionals sobre la proteïna, obre una nova línia de investigació interessant. Per tant, en un futur caldrà invertir esforços per comprendre quin és el paper de S5D-SRCRB en un ambient tan particular com és aquell que manté les cèl·lules mare renals quiescents.

Paral·lelament, s'ha observat que mS5D-SRCRB s'expressa en els túbuls seminífers allí on ho fan els espermatòcits primaris (I) i secundaris (II) (Tokuda, Kadokawa et al. 2007). Tot i que aquests tipus cel·lulars en cap cas es poden considerar cèl·lules mare, sí són precursors de les espermatòides que, al seu torn, donen lloc als espermatozous.

Una altra particularitat del sistema excretor és el fort gradient d'hipòxia i hiperosmolaritat que es crea, a mesura que es va formant i concentrant l'orina. Es coneix que aquests dos factors són un senyal poderós per a l'expressió de determinades proteïnes (Burg, Ferraris et al. 2007; Halterman, Kwon et al.

2012). L'HIF i el NFAT5 són dos exemples de factors de transcripció que medien en la resposta dels teixits a situacions d'hipòxia i estrés osmòtic, respectivament. Si s'observen les tincions de mS5D-SRCRB en el ronyó es pot valorar que la seva expressió és més destacada a mesura que és més distal, de manera paral·lela als gradients citats. Aquests indicis permeten especular amb la possibilitat que l'expressió de mS5D-SRCRB s'associï amb la senyalització d'algun d'aquests dos factors. Si s'analitza el promotor del gen *s5d-srcrb* es veu com aquest conté tres motius *binding site* per a HIF. Malgrat aquests indicis, de moment, l'associació entre l'expressió de S5D-SRCRB i estats d'estrés osmòtic i hipòxia només es pot considerar una hipòtesi de partida per a nous treballs.

Els túbuls col·lectors són un segment molt especialitzat de la nefrona, i estan formats –com s'ha descrit a la introducció– per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules principals i les intercalades. Ambdues tenen un origen comú, però mitjançant una senyalització via Notch esdevenent finalment tipus cel·lulars distintes (Jeong, Jeon et al. 2009). Mitjançant tècniques d'immunocolocalització, es va observar clarament que S5D-SRCRB es trobava en la part apical de les cèl·lules principals. En canvi, la colocalització de mS5D-SRCRB amb les cèl·lules intercalades era més incerta.

Per tal d'aclarir aquest punt, es va treballar amb un model de diferenciació cel·lular amb la línia cel·lular Clone C, que deriva de cèl·lules intercalades de conill tipus β . Tot cultivant la clona C per tal que es diferenciés en els dos tipus cel·lulars "canònics" de les cèl·lules intercalades, i tenyint-los per S5D-SRCRB -permeabilitzant i sense permeabilitzar les preparacions- es va poder determinar que S5D-SRCRB s'exposa principalment en la membrana apical dels cultius a alta densitat cel·lular o HD (fenotip α -IC). Les cèl·lules α -IC representen l'estadi més diferenciat de les cèl·lules intercalades que, com ja s'ha dit, requereix la secreció i polimerització de DMBT1/hensin.

Tenint en compte que els epitelis són la primera línia de defensa dels organismes enfront les possibles infeccions, i el fet que el reconeixement de

PAMPs és una característica comuna entre alguns membres de la SRCR-SF (DMBT1, CD5, CD6, Sp α són alguns exemples), es va valorar la possibilitat que S5D-SRCRB també actués com a PRR. A partir d'assajos d'ELISA amb diferents PAMPs i la incubació de la proteïna amb microorganismes intactes, es va poder determinar que S5D-SRCRB s'uneix de manera directa i dosi-depenent a components molt conservats de les parets de bacteris Gram negatius (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolítica*, *S. flexneri*), Gram-positius (*S. aureus*, *S. epidermidis*) i fongs saprofítics (*S. cerevisiae* i *S. pombe*) i patogènics (*A. fumigatus*, *C. albicans* i *C. neoformans*).

Però, a més d'unir-s'hi, el receptor és capaç d'agregar-los com es demostra per *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus* i *C. albicans*. Segons els assajos d'ELISA realitzats, el reconeixement dels microorganismos es deuria a la unió de la proteïna a components molt conservats i ampliament distribuïts en les parets bacterianes (LPS i PGN) i fúngiques (β -glucans lineals).

Havent determinat que mS5D-SRCRB és una proteïna altament glicosilada i expressada al llarg del tracte urogenital, es va considerar interessant estudiar si juga un paper en la infecció d'orina. Per això hem de tenir en compte el tipus de glicosilació exposat en el tracte urinari influeix en el fet que posteriorment s'hi adhereixin i estableixin agents patògens (Pak, Pu et al. 2001).

Una primera aproximació, *in vitro*, va consistir en observar l'expressió de S5D-SRCRB en cultius de clone C exposats apicalment a PGN. L'assaig realitzat amb cultius LD i HD de clone C va revelar que l'exposició de S5D-SRCRB augmentava en els cultius LD, que en condicions normals presentaven els nivells extracel·lulars més baixos de la proteïna. La identificació d'una línia cel·lular que expressa S5D-SRCRB constitucionalment i que canvia el seu patró d'expressió davant un estímul (en aquest cas el PGN), constitueix en si mateix un èxit. La descoberta d'un model cel·lular per a l'estudi de S5D-SRCRB permetrà realitzar nous experiments funcionals que aportaran noves dades sobre una proteïna de la qual –abans de la realització d'aquesta tesi– només

se'n coneixia el gen.

Una segona aproximació, més fisiològica, a la pregunta de si mS5D-SRCRB pot intervenir en resposta a una infecció d'orina, va consistir en comparar els nivells d'expressió de *s5d-srcrb* en ronyons de ratolins controls i sotmesos a un model experimental de UTI (*Urinary Tract Infection*) per *E. coli* UPEC (causant del 90% de les infeccions d'orina). L'experiment va revelar que l'expressió de *s5d-srcrb* a nivell de RNA està lleugerament regulat a l'alça en els ronyons infectats. Si tenim en compte que la infecció aplicada va ser lleu (només durant 24h) i que es va analitzar l'expressió de tot el ronyó, i no únicament de les regions més distals (on l'expressió de S5D-SRCRB és major), l'increment observat -si bé moderat- es pot considerar rellevant.

La seqüència del promotor de *s5d-srcrb* presenta llocs putatius d'unió a factors NF-KB. Per tant, seria possible que la regulació a l'alça detectada es degués a la senyalització via NF-KB. Aquesta possibilitat es va demostrar en el cas de DMBT1, l'expressió del qual és estimulada mitjançant la senyalització de factors NF-KB en l'intestí (Rosenstiel, Sina et al. 2007).

Durant molts anys la matriu extracel·lular (ECM) va ser vista tan sols com una bastida per a l'organització cel·lular dins dels teixits connectius, però darrerament el seu rol biològic està sent redefinit. Actualment s'entén que l'ECM juga un paper dinàmic i clau en el comportament cel·lular. Els constituents moleculars de l'ECM formen grans complexes que senyalitzen per a la diferenciació, el desenvolupament i la funció dels teixits que sosté (Aszodi, Legate et al. 2006). Un exemple d'aquesta senyalització és la unió entre DMBT1 i Gal-3. La primera és polimeritzada gràcies a la interacció amb Gal-3, entre d'altres proteïnes de l'ECM, fet que desencadena la diferenciació terminal de les IC. Es va pensar que una situació semblant podria donar-se amb S5D-SRCRB. Amb l'objectiu d'aprofundir en aquest nou capítol de la nostra recerca sobre S5D-SRCRB, es van realitzar assajos d'unió directa per ELISA i de competició revelats per WB. Els resultats obtinguts mostren que S5D-SRCRB és capaç de

reconèixer components endògens propis de l'ECM. Concretament, S5D-SRCRB s'uneix a laminina i (en menor mesura) a fibronectina, així com a les galectines 1 i 3 (mitjançant els seus CRD).

L'expressió que S5D-SRCRB presenta en epitelis dels tractes digestiu i urogenital d'adults és eminentment luminal, coincidint allà on el contacte amb PAMPs és més freqüent. Aquest punt crida l'atenció perquè l'existència d'una ECM definida es dona en la part basolateral de les cèl·lules i no pas a les apicals, on hom es refereix al glucocàlix. Tot i que la capacitat de S5D-SRCRB per comunicar-se amb components de l'ECM planteja diverses qüestions, com en el cas del possible paper de S5D-SRCRB en l'ECM de les cèl·lules mare renals, aquestes hauran de ser abordades en futurs treballs.

Però, amb les dades disponibles, es pot especular amb diverses possibilitats: una d'elles seria que la interacció observada entre S5D-SRCRB i Gal-3 en la part apical del tracte urinari indicaria una col·laboració de les dues proteïnes en el reconeixement específic d'agents patògens. Si bé el receptor *scavenger* s'uneix a motius microbians àmpliament distribuïts -tant en organismes saprofítics com patògens-, s'ha descrit que la Gal-3 és capaç de reconèixer glicosilacions exclusives de patògens (Esteban, Popp et al. 2011). La literatura, com s'ha esmentat en la introducció per a dectin-1, descriu casos on la interacció d'un PRR amb Gal-3 permet diferenciar entre flora saprofítica i microbis patògens.

Per tant, el motiu de la col·localització de S5D-SRCRB i Gal-3 observada en la part luminal de la bufeta urinària podria ser reconèixer específicament agents patògens potencials causants d'una infecció d'orina. Recentment, a més, s'ha reportat que la interacció entre la fibronectina i el CD163 (membre del grup B de la SRCR-SF) és clau per dur a terme una sofisticada estratègia per atacar *S. aureus*, a més d'evitar que aquest s'adhereixi a la fibronectina (que és un mecanisme fonamental per establir infeccions de *S. aureus* altament invasius) (Kneidl, Loffler et al. 2012).

Tots aquests indicis destaquen les diverses potencialitats que el reconeixement de proteïnes de l'ECM per part de S5D-SRCRB presenta.

Paral·lelament als estudis realitzats per a S5D-SRCRB, també es va voler aprofundir en el coneixement de la proteïna hS4D-SRCRB. Fins al moment, es tenien dades sobre el gen, del que s'havia determinat –mitjançant estudis de Northern blot– que presentava un patró d'expressió restringit tissular (principalment en el ronyó i la placenta) per l'espècie d'ARNm major (2,8 kb), i una distribució tissular més àmplia per l'altra espècie (de 1,5 kb) (Padilla, Pujana et al. 2002).

Malauradament, cap dels anticossos testats per a hS4D-SRCRB ha donat un resultat positiu i específic que permeti comprovar l'expressió de la proteïna en teixits. Ara bé, resultats preliminars amb tècniques de immunofluorescència confirmarien l'expressió de S4D-SRCRB en la línia cel·lular HepG2 derivada d'un hepatoma humà, que altres membres del grup havien descrit que expressa S4D-SRCRB (Padilla, Pujana et al. 2002).

Ja que les seqüències dels dominis SRCR de mS5D- i hS4D-SRCRB són molt similars, com s'ha dit anteriorment en aquesta discussió, es va estudiar també la capacitat del darrer per reconèixer PAMPs. Els assajos d'ELISA realitzats amb la forma recombinant de hS4D-SRCRB van revelar que s'uneix de manera directa i dosi-depenent a LPS i PGN (propis de bacteris) i Zymosan, quitina i β -glucà lineal (propis de fongs). Paral·lelament, hS4D-SRCRB també reconeix i agrega bacteris Gram postius (*S. aureus*), negatius (*E. coli* i *K. oxytoca*) i fongs (*C. albicans*).

Per tal de comprendre quin podria ser el paper de la glicoproteïna hS4D-SRCRB en la resposta a patògens, es va voler estudiar un model *in vitro* que reproduiria alguns escenaris que es donen durant una infecció. Amb aquesta finalitat, es van quantificar els nivells d'IL-8 (quimiocina pro-inflamatòria) en els sobrenedants dels cultius de cèl·lules HepG2 incubades durant 24h amb PGN,

rhS4D-SRCRB-HA, un anticòs comercial (Ab-II) i combinacions dels mateixos. Els resultats d'aquest estudi van revelar que en presència de hS4D-SRCRB els nivells de l'IL-8 secretada augmentaven, en els cultius agredits amb un component de la paret bacteriana. Per tant, existeixen indicis per postular que S4D-SRCRB té un paper pro-inflamatori en la resposta innata envers agents infecciosos. És cert, però, que per tal de ratificar aquesta idea i dibuixar un model més acurat sobre el rol funcional de S4D-SRCRB caldrà detallar l'expressió de la proteïna en teixits i tipus cel·lulars, així com l'estat fisiològic en que dita expressió es produeix.

El possible paper pro-inflamatori de hS4D-SRCRB contrasta amb l'observat per mS5D-SRCRB, que semblaria que té una acció anti-inflamatòria. Les divergències en el resultat final dels dos estudis es podrien explicar perquè, si bé ambdós assajos segueixen el mateix procediment, es van realitzar emprant línies cel·lulars diferents: Hek EBNA (amb i sense transfectar amb TLR2) per mS5D-SRCRB i HepG2 per hS4D-SRCRB. Una altra possible raó seria que els dos receptors *scavenger* realitzessin funcions antagòniques en escenaris de dany tissular. D'aquesta manera, el paper de hS4D-SRCRB podria centrar-se en augmentar les senyals inflamatòries (*danger signals*), per tal d'activar el sistema immunològic davant d'una agressió, mentre que mS5D-SRCRB estaria evitant una inflamació exacerbada que afectés a la integritat de epitelis, la primera línia de defensa de l'organisme.

Un cop exposats els resultats aportats en aquesta tesi i debatudes les seves possibles interpretacions, es valora que la investigació realitzada ha aportat noves dades sobre la funcionalitat dels tres receptors solubles *scavenger* del grup B.

A més, s'han obert noves línies d'investigació per a les proteïnes S5D-SRCRB i S4D-SRCRB, de les quals es disposava d'una informació molt limitada a l'inici d'aquesta tesi. En el futur, però, seran necessaris nous estudis per detallar la

regulació i acció dels tres receptors SRCR en processos de diferenciació i manteniment de l'homeòstasi.

Conclusions

I. S'ha reportat i caracteritzat un nou gen murí que codifica per a un nou membre de la SF-SRCRB: mS5D-SRCRB.

➤ mS5D-SRCRB és una proteïna de secreció i altament glicosilada (N- i O-glicosilacions, mucin-like) que té un patró d'expressió tissular restringit principalment epitelis dels tractes digestiu i urogenital.

➤ mS5D-SRCRB és un component del sistema immunitari innat a causa de la seva capacitat d'unió i agregació de bacteris i fongs, així com d'interferir les propietats pro-inflamatòries de components molt conservats de les parets cel·lular d'aquests microorganismes i d'augmentar la seva expressió enfront agressions microbianes.

➤ mS5D-SRCRB podria estar relacionat amb processos de diferenciació cel·lular donada la seva expressió selectiva en l'entorn de certs tipus cel·lulars especialitzats (cèl·lules intercalades dels túbuls col·lectors renals i espermatòcits) i la seva interacció amb components de la matriu extracel·lular (Galectines i Laminin).

II. S'ha expressat i caracteritzat estructural i funcionalment una forma recombinant d'un nou membre soluble de la SF-SRCR (hS4D-SRCRB) previament reportat en humans.

➤ hS4D-SRCRB és una glicoproteïna de secreció que conté només glicosilacions de tipus O.

➤ hS4D-SRCRB és també un component de l'immunitat innata humoral donada la seva capacitat d'unió a components conservats de les parets bacterianes i fúngiques i d'induir l'agregació d'aquests microorganismes.

- En contraposició a mS5D-SRCRB, la presència de hS4D-SRCRB en situacions d'agressió microbiana afavoriria la generació de senyals de perill com és la secreció de citocines pro-inflamatòries (IL-8).

III. S'ha estudiat i confirmat en models murins modificats genèticament el paper essencial de DMBT1 en el procés de diferenciació terminal que pateixen les cèl·lules intercalades (IC) dels túbuls col·lectors renals en condicions d'acidosi, i pel que passen d'expressar un fenotip de β -IC a un α -IC.

Bibliografia

- Adams, E. L., P. J. Rice, et al. (2008). "Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching." *J Pharmacol Exp Ther* **325**(1): 115-123.
- Akaiwa, M., Y. Yae, et al. (1999). "Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile." *J Histochem Cytochem* **47**(6): 777-786.
- Akila, P., V. Prashant, et al. (2012). "CD163 and its expanding functional repertoire." *Clin Chim Acta* **413**(7-8): 669-674.
- Al-Awqati, Q. and X. B. Gao (2011). "Differentiation of intercalated cells in the kidney." *Physiology (Bethesda)* **26**(4): 266-272.
- Al-Awqati, Q. and J. A. Oliver (2006). "The kidney papilla is a stem cells niche." *Stem Cell Rev* **2**(3): 181-184.
- Al-Awqati, Q., S. Vijayakumar, et al. (1999). "Terminal differentiation in epithelia: the Hensin pathway in intercalated cells." *Semin Nephrol* **19**(5): 415-420.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, et al. (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." *J Biol Chem* **275**(26): 20157-20167.
- Aszodi, A., K. R. Legate, et al. (2006). "What mouse mutants teach us about extracellular matrix function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 591-621.
- Biancone, L., M. A. Bowen, et al. (1996). "Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes." *J Exp Med* **184**(3): 811-819.
- Bikker, F. J., A. J. Ligtenberg, et al. (2004). "Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains." *J Biol Chem* **279**(46): 47699-47703.
- Bikker, F. J., A. J. Ligtenberg, et al. (2002). "Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily." *J Biol Chem* **277**(35): 32109-32115.
- Bittel, P. and S. Robatzek (2007). "Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity." *Curr Opin Plant Biol* **10**(4): 335-341.
- Blumbach, B., Z. Pancer, et al. (1998). "The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats." *J Cell Sci* **111 (Pt 17)**: 2635-2644.
- Bowdish, D. M. and S. Gordon (2009). "Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function." *Immunol Rev* **227**(1): 19-31.
- Bowen, M. A., J. Bajorath, et al. (1996). "The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry." *J Biol Chem* **271**(29): 17390-17396.
- Bowen, M. A., D. D. Patel, et al. (1995). "Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand." *J Exp Med* **181**(6): 2213-2220.
- Bowen, M. A., G. S. Whitney, et al. (1997). "Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms." *J Immunol* **158**(3): 1149-1156.
- Braun M, Müller B et al. (2011). "The CD6 scavenger receptor is differentially expressed on a CD56 natural killer cell subpopulation and contributes to natural killer-derived cytokine and chemokine secretion." *J Innate Immun* **3**(4):420-34
- Brown, J., C. A. O'Callaghan, et al. (2007). "Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function." *Protein Sci* **16**(6): 1042-1052.
- Brown, M. H. and E. Lacey (2010). "A ligand for CD5 is CD5." *J Immunol* **185**(10): 6068-6074.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis." *Annu Rev Biochem* **52**: 223-261.
- Bullock, S. L., T. M. Johnson, et al. (2001). "Galectin-3 modulates ureteric bud branching in organ culture of the developing mouse kidney." *J Am Soc Nephrol* **12**(3): 515-523.
- Burg, M. B., J. D. Ferraris, et al. (2007). "Cellular response to hyperosmotic stresses." *Physiol Rev* **87**(4): 1441-1474.

- Calvo, J., L. Places, et al. (1999). "Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand." *Eur J Immunol* **29**(7): 2119-2129.
- Camby, I., M. Le Mercier, et al. (2006). "Galectin-1: a small protein with major functions." *Glycobiology* **16**(11): 137R-157R.
- Cervera, A., A. M. Planas, et al. (2010). "Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke." *PLoS One* **5**(2): e8433.
- Cooper, D. N. (2002). "Galectinomics: finding themes in complexity." *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3): 209-231.
- De Lisle, R. C., W. Xu, et al. (2008). "Effects of Muclin (Dmbt1) deficiency on the gastrointestinal system." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(3): G717-727.
- Du Pasquier, L. (2001). "The immune system of invertebrates and vertebrates." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**(1): 1-15.
- Drummond Rebecca A, Gordon D Brown (2011). "The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections." *Current Opinion in Microbiology* **14**(4): 392-399
- Dumic, J., S. Dabelic, et al. (2006). "Galectin-3: an open-ended story." *Biochim Biophys Acta* **1760**(4): 616-635.
- Dzik, J. M. (2010). "The ancestry and cumulative evolution of immune reactions." *Acta Biochim Pol* **57**(4): 443-466.
- Endo, Y., M. Matsushita, et al. (2007). "Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis." *Immunobiology* **212**(4-5): 371-379.
- Epstein, J., Q. Eichbaum, et al. (1996). "The collectins in innate immunity." *Curr Opin Immunol* **8**(1): 29-35.
- Esteban, A., M. W. Popp, et al. (2011). "Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14270-14275.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "CD4+ Tregs and immune control." *J Clin Invest* **114**(9): 1209-1217.
- Feizi, T. (2000). "Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity." *Immunol Rev* **173**: 79-88.
- Fraser, I. P., H. Koziel, et al. (1998). "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity." *Semin Immunol* **10**(5): 363-372.
- Fujiu, K., I. Manabe, et al. (2011). "Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice." *J Clin Invest* **121**(9): 3425-3441.
- Gadjeva, M., S. Thiel, et al. (2001). "The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 74-78.
- Garlatti, V., L. Martin, et al. (2010). "Structural insights into the recognition properties of human ficolins." *J Innate Immun* **2**(1): 17-23.
- Garza-Garcia, A., D. Esposito, et al. (2008). "Three-dimensional solution structure and conformational plasticity of the N-terminal scavenger receptor cysteine-rich domain of human CD5." *J Mol Biol* **378**(1): 129-144.
- Gebe, J. A., P. A. Kiener, et al. (1997). "Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins." *J Biol Chem* **272**(10): 6151-6158.
- Gimferrer, I., M. Farnos, et al. (2003). "The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells." *J Biol Chem* **278**(10): 8564-8571.
- Goncalves, C. M., M. A. Castro, et al. (2009). "Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily." *Mol Immunol* **46**(13): 2585-2596.
- Gough, P. J. and S. Gordon (2000). "The role of scavenger receptors in the innate immune system." *Microbes Infect* **2**(3): 305-311.
- Gough, P. J., D. R. Greaves, et al. (1998). "A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake." *J Lipid Res* **39**(3): 531-543.
- Greenspan, N. S. (2001). "Dimensions of antigen recognition and levels of immunological specificity." *Adv Cancer Res* **80**: 147-187.

- Halterman, J. A., H. M. Kwon, et al. (2012). "Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5)." *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(1): C1-8.
- Hanisch, F. G. and S. Muller (2000). "MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin." *Glycobiology* **10**(5): 439-449.
- Hikita, C., S. Vijayakumar, et al. (2000). "Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3." *J Cell Biol* **151**(6): 1235-1246.
- Hippen, K. L., L. E. Tze, et al. (2000). "CD5 maintains tolerance in anergic B cells." *J Exp Med* **191**(5): 883-890.
- Hohenester, E., T. Sasaki, et al. (1999). "Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily." *Nat Struct Biol* **6**(3): 228-232.
- Holmskov, U., J. Mollenhauer, et al. (1999). "Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10794-10799.
- Holmskov, U. L. (2000). "Collectins and collectin receptors in innate immunity." *APMIS Suppl* **100**: 1-59.
- Honore, C., S. Rorvig, et al. (2008). "The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma." *Mol Immunol* **45**(10): 2782-2789.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Jeong, H. W., U. S. Jeon, et al. (2009). "Inactivation of Notch signaling in the renal collecting duct causes nephrogenic diabetes insipidus in mice." *J Clin Invest* **119**(11): 3290-3300.
- Jiang, Y., P. Oliver, et al. (2006). "Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells." *J Biol Chem* **281**(17): 11834-11845.
- Jouault, T., M. El Abed-El Behi, et al. (2006). "Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling." *J Immunol* **177**(7): 4679-4687.
- Kamoun, M., M. E. Kadin, et al. (1981). "A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas." *J Immunol* **127**(3): 987-991.
- Kang, W., O. Nielsen, et al. (2005). "Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer." *Carcinogenesis* **26**(6): 1129-1137.
- Kang, W. and K. B. Reid (2003). "DMBT1, a regulator of mucosal homeostasis through the linking of mucosal defense and regeneration?" *FEBS Lett* **540**(1-3): 21-25.
- Kassiotis, G., R. Zamoyska, et al. (2003). "Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells." *J Exp Med* **197**(8): 1007-1016.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* **34**(5): 637-650.
- Kingeter, L. M. and X. Lin (2012). "C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses." *Cell Mol Immunol* **9**(2): 105-112.
- Kluth, D., H. C. Fiegel, et al. (2011). "Embryology of the distal urethra and external genitals." *Semin Pediatr Surg* **20**(3): 176-187.
- Kneidl, J., B. Loffler, et al. (2012). "Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides." *Cell Microbiol* **14**(6): 914-936.
- Kohatsu, L., D. K. Hsu, et al. (2006). "Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans." *J Immunol* **177**(7): 4718-4726.
- Kurokawa, J., S. Arai, et al. (2010). "Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity." *Cell Metab* **11**(6): 479-492.
- Kuwata, K., H. Watanabe, et al. (2003). "AIM inhibits apoptosis of T cells and NKT cells in *Corynebacterium*-induced granuloma formation in mice." *Am J Pathol* **162**(3): 837-847.
- Law, S. K., K. J. Micklem, et al. (1993). "A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily." *Eur J Immunol* **23**(9): 2320-2325.
- Li, J. Y., N. Paragas, et al. (2009). "Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery." *Dev Cell* **16**(1): 35-46.

- Liao, H. S., T. Kodama, et al. (2000). "Expression of class A scavenger receptor inhibits apoptosis of macrophages triggered by oxidized low density lipoprotein and oxysterol." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(8): 1968-1975.
- Ligtenberg, T. J., F. J. Bikker, et al. (2001). "Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340." *Biochem J* **359**(Pt 1): 243-248.
- Liu, W., S. M. Shen, et al. (2012). "Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1." *Int J Biochem Mol Biol* **3**(2): 165-178.
- Liu, Y., Y. Endo, et al. (2005). "Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway." *J Immunol* **175**(5): 3150-3156.
- Lozano, F., M. Simarro, et al. (2000). "CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling." *Crit Rev Immunol* **20**(4): 347-358.
- Ma, J. F., J. Takito, et al. (2001). "Prostatic expression of hensin, a protein implicated in epithelial terminal differentiation." *Prostate* **49**(1): 9-18.
- Madsen, J., J. Mollenhauer, et al. (2010). "Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity." *Innate Immun* **16**(3): 160-167.
- Martinez, V. G., S. K. Moestrup, et al. (2011). "The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis." *Pharmacol Rev* **63**(4): 967-1000.
- Matsushita, M. (2010). "Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity." *J Innate Immun* **2**(1): 24-32.
- Matsushita, M. (2012). "Ficolins in complement activation." *Mol Immunol*.
- Matsushita, M. and T. Fujita (2002). "The role of ficolins in innate immunity." *Immunobiology* **205**(4-5): 490-497.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." *Cell* **91**(3): 295-298.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." *Science* **296**(5566): 298-300.
- Miao, E. A. and S. E. Warren (2010). "Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome." *J Clin Immunol* **30**(4): 502-506.
- Miro-Julia, C., S. Rosello, et al. (2011). "Molecular and functional characterization of mouse S5D-SRCRB: a new group B member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily." *J Immunol* **186**(4): 2344-2354.
- Miyazaki T, Mori M et al. (2012). "Modification of N-glycosylation modulates the secretion and lipolytic function of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)." *FEBS Lett.* **586**(20):3569-74.
- Miyazaki, T., Y. Hirokami, et al. (1999). "Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily." *J Exp Med* **189**(2): 413-422.
- Mollenhauer, J., M. Deichmann, et al. (2003). "Frequent downregulation of DMBT1 and galectin-3 in epithelial skin cancer." *Int J Cancer* **105**(2): 149-157.
- Mollenhauer, J., B. Helmke, et al. (2002). "Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas." *Genes Chromosomes Cancer* **35**(2): 164-169.
- J. Mollenhauer, C. End et al. (2007) "DMBT1 as an archetypal link between infection, inflammation, and cancer" *Inmunología* **26**(4):193-209.
- Mollenhauer, J., S. Herbertz, et al. (2000). "DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer." *Cancer Res* **60**(6): 1704-1710.
- Mollenhauer, J., U. Holmskov, et al. (1999). "The genomic structure of the DMBT1 gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability." *Oncogene* **18**(46): 6233-6240.
- Mollenhauer, J., S. Wiemann, et al. (1997). "DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours." *Nat Genet* **17**(1): 32-39.
- Morris, S., N. Ahmad, et al. (2004). "Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7." *Glycobiology* **14**(3): 293-300.
- Mushegian, A. and R. Medzhitov (2001). "Evolutionary perspective on innate immune recognition." *J Cell Biol* **155**(5): 705-710.

- Nielsen, M. J., M. Madsen, et al. (2006). "The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants." *J Leukoc Biol* **79**(4): 837-845.
- Nio, J., H. Takahashi-Iwanaga, et al. (2006). "Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in the urinary system of adult mice." *Histochem Cell Biol* **126**(1): 45-56.
- Ojala, J. R., T. Pikkarainen, et al. (2007). "Crystal structure of the cysteine-rich domain of scavenger receptor MARCO reveals the presence of a basic and an acidic cluster that both contribute to ligand recognition." *J Biol Chem* **282**(22): 16654-16666.
- Oliveira-Nascimento, L., P. Massari, et al. (2012). "The Role of TLR2 in Infection and Immunity." *Front Immunol* **3**: 79.
- Oliveira MI, Gonçalves CM, et al. (2012). "CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation." *Eur J Immunol*. **42**(1):195-205.
- Oliver, J. A., A. Klinakis, et al. (2009). "Proliferation and migration of label-retaining cells of the kidney papilla." *J Am Soc Nephrol* **20**(11): 2315-2327.
- Ordóñez-Rueda, D., F. Lozano, et al. (2009). "Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling." *Eur J Immunol* **39**(8): 2233-2247.
- Osorio, L. M., C. A. Garcia, et al. (1994). "The anti-CD6 mAb, IOR-T1, defined a new epitope on the human CD6 molecule that induces greater responsiveness in T cell receptor/CD3-mediated T cell proliferation." *Cell Immunol* **154**(1): 123-133.
- Ouellet, M., S. Mercier, et al. (2005). "Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells." *J Immunol* **174**(7): 4120-4126.
- Padilla, O., M. A. Pujana, et al. (2002). "Cloning of S4D-SRCRB, a new soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich family (SRCR-SF) mapping to human chromosome 7q11.23." *Immunogenetics* **54**(9): 621-634.
- Pahler, S., B. Blumbach, et al. (1998). "Putative multiadhesive protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR-, and a complement control protein module." *J Exp Zool* **282**(3): 332-343.
- Pak, J., Y. Pu, et al. (2001). "Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors." *J Biol Chem* **276**(13): 9924-9930.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, et al. (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 123-128.
- Platt, N. and S. Gordon (2001). "Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale." *J Clin Invest* **108**(5): 649-654.
- Pluddemann, A., C. Neyen, et al. (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." *Methods* **43**(3): 207-217.
- Pluddemann, A., C. Neyen, et al. (2008). "A sensitive solid-phase assay for identification of class A macrophage scavenger receptor ligands using cell lysate." *J Immunol Methods* **329**(1-2): 167-175.
- Ponting, C. P. and R. R. Russell (2002). "The natural history of protein domains." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 45-71.
- Pospisil, R., G. J. Silverman, et al. (2000). "CD5 is a potential selecting ligand for B-cell surface immunoglobulin: a possible role in maintenance and selective expansion of normal and malignant B cells." *Leuk Lymphoma* **36**(3-4): 353-365.
- Ritter, M., C. Buechler, et al. (2001). "Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C." *Eur J Immunol* **31**(4): 999-1009.
- Ritter, M., C. Buechler, et al. (1999). "Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(2): 466-474.
- Robinson, W. H., H. E. Neuman de Vegvar, et al. (1995). "Human CD6 possesses a large, alternatively spliced cytoplasmic domain." *Eur J Immunol* **25**(10): 2765-2769.
- Rodamilans, B., I. G. Munoz, et al. (2007). "Crystal structure of the third extracellular domain of CD5 reveals the fold of a group B scavenger cysteine-rich receptor domain." *J Biol Chem* **282**(17): 12669-12677.

- Rosenstiel, P., C. Sina, et al. (2007). "Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion." *J Immunol* **178**(12): 8203-8211.
- Sadowski, J. and L. Dobrowolski (2003). "The renal medullary interstitium: focus on osmotic hypertonicity." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(3): 119-126.
- Sarrias, M. R., M. Farnos, et al. (2007). "CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28): 11724-11729.
- Sarrias, M. R., J. Gronlund, et al. (2004). "The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system." *Crit Rev Immunol* **24**(1): 1-37.
- Sarrias, M. R., S. Rosello, et al. (2005). "A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor." *J Biol Chem* **280**(42): 35391-35398.
- Schaer, D. J., C. A. Schaer, et al. (2006). "CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin." *Blood* **107**(1): 373-380.
- Schwartz, G. J. and Q. Al-Awqati (2005). "Role of hensin in mediating the adaptation of the cortical collecting duct to metabolic acidosis." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**(4): 383-388.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 469-478.
- Singer, N. G., B. C. Richardson, et al. (1996). "Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes." *Immunology* **88**(4): 537-543.
- Soldevila G, Raman C, Lozano F (2011). "The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease." *Curr Opin Immunol* **23**(3):310-8.
- Soudan, B., D. Tetaert, et al. (1998). "Dipeptidyl aminotransferase activity and in vitro O-glycosylation of MUC5AC mucin motif peptides by human gastric microsomal preparations." *J Pept Res* **51**(5): 346-354.
- Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." *Curr Opin Immunol* **10**(1): 50-55.
- Stamou, P., J. de Jersey, et al. (2003). "Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells." *J Immunol* **171**(3): 1278-1284.
- Stoddard, E., H. Ni, et al. (2009). "gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue." *J Virol* **83**(17): 8596-8603.
- Tipping, P. G. (2006). "Toll-like receptors: the interface between innate and adaptive immunity." *J Am Soc Nephrol* **17**(7): 1769-1771.
- Tokuda, M., Y. Kadokawa, et al. (2007). "CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes." *Biol Reprod* **76**(1): 130-141.
- Tynan, S., E. Pacia, et al. (2005). "The putative tumor suppressor deleted in malignant brain tumors 1 is an estrogen-regulated gene in rodent and primate endometrial epithelium." *Endocrinology* **146**(3): 1066-1073.
- van Adelsberg, J., J. C. Edwards, et al. (1994). "An induced extracellular matrix protein reverses the polarity of band 3 in intercalated epithelial cells." *Cell* **76**(6): 1053-1061.
- Van Gorp H, Van Breedam W, et al. (2010). "Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *J. Virol.* **284**(6):3101-5.
- Van de Velde, H., I. von Hoegen, et al. (1991). "The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5." *Nature* **351**(6328): 662-665.
- Van den Heuvel, M. M., C. P. Tensen, et al. (1999). "Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation." *J Leukoc Biol* **66**(5): 858-866.

- Vanstherthem, D., et al., *Immunohistochemical localization of galectins-1 and -3 and monitoring of tissue galectin-binding sites during tubular regeneration after renal ischemia reperfusion in the rat.* *Histol Histopathol*, 2010. **25**(11): p. 1417-29.
- Vasta, G. R., H. Ahmed, et al. (2012). "Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox." *Front Immunol* **3**: 199.
- Vautier, S., D. M. MacCallum, et al. (2012). "C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity." *Cytokine* **58**(1): 89-99.
- Vera, J., R. Fenutria, et al. (2009). "The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(5): 1506-1511.
- Vijayakumar, S., J. Takito, et al. (2006). "Differentiation of columnar epithelia: the hensin pathway." *J Cell Sci* **119**(Pt 23): 4797-4801.
- Wells, J. M., O. Rossi, et al. (2011). "Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**: 4607-4614.
- White, M. R., E. Crouch, et al. (2005). "Respiratory innate immune proteins differentially modulate the neutrophil respiratory burst response to influenza A virus." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(4): L606-616.
- Whitney, G. S., G. C. Starling, et al. (1995). "The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site." *J Biol Chem* **270**(31): 18187-18190.
- Yanaba, K., J. D. Bouaziz, et al. (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." *Immunity* **28**(5): 639-650.
- Zhang, W. and A. Edwards (2002). "Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(3): H1042-1055.

Publicacions

1. Deletion of hensin/DMBT1 blocks conversion of β - to α -intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis. Gao X, Eladari D, Leviel F, Tew BY, **Miró-Julià C**, Cheema F, Miller L, Nelson R, Paunescu TG, McKee M, Brown D, Al-Awqati Q. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 22.
2. Molecular and Functional Characterization of Mouse S5D-SRCRB: A New Group B Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily. **Miró-Julià C**, Roselló S, Martínez VG, R Fink D, Escoda-Ferran C, Padilla O, Vázquez-Echeverría C, Espinal-Marin P, Pujades C, García-Pardo A, Vila J, Serra-Pagès C, Holmskov U, Yélamos J, Lozano F. *J Immunol*. 2011 Jan 7.
3. Expression of S5D-SRCRB in the urogenital tract. **Cristina Miró-Julià**, Cristina Escoda-Ferran, Esther Carrasco, Jesper Bonet, Dorte R. Fink, Xiabo Gao, Neal Paraguas, Juan Oliver, Qais Al-Awqati, Uffe Holmskov, Francisco Lozano (*Manuscrit en preparació*).
4. S4D-SRCRB, a soluble member of the group B scavenger receptor cysteine-rich superfamily is a dual-specific pattern recognition receptor for self and non-self structures. **Cristina Miró-Julià**, Sandra Roselló, Olga Padilla, José Yelamos J, Jordi Vila, Francisco Lozano (*Manuscrit en preparació*).

Congressos

2012	Pòster 99th American Association of Immunologists (AAI) Annual meeting Boston, Massachusetts; EUA
2011	Comunicació oral i pòster 36ºCongreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) Pamplona, Espanya
2010	Comunicació oral i pòster 35ºCongreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) San Sebastian, Espanya
2009	Comunicació oral i pòster 2nd European Congress of Immunology (ECI) Berlín, Alemanya
	Comunicació oral III Congreso de la Societat Catalana d'Immunologia (SCI) Barcelona, Catalunya

