



Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
e Inmunología

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina (D11.56.1)

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA EN MACRÓFAGOS POR LA MOLÉCULA DE LA FAMILIA DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN DE SEÑALIZACIÓN DE LINFOCITOS (SLAMF)8.

Memoria presentada por Domingo Isaac Rojas Barros para
optar al título de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Domingo Isaac Rojas Barros
D.L.: GR 1051-2014
ISBN: 978-84-9028-954-9



Universidad de Granada



El doctorando DOMINGO ISAAC ROJAS BARROS y los directores de la tesis ANA CLARA ABADÍA MOLINA y FRANCISCO ABADÍA MOLINA, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA, 22 DE NOVIEMBRE DE 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Ana Clara Abadía Molina

Fdo.: Domingo Isaac Rojas Barros

Fdo.: Francisco Abadía Molina

A mi familia,

ÍNDICE

SUMMARY	9
RESUMEN	12
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	21
1.- Monocitos y macrófagos	23
1.1.- Descripción morfológica	23
1.2.- Origen y diferenciación de monocitos y macrófagos	24
1.3.- Subpoblaciones de monocitos y su función	25
1.3.1.- Monocitos en ratón	25
1.3.2.- Monocitos en humano	27
1.4.- Subconjuntos de macrófagos y su función	29
1.4.1.- Distribución tisular de los macrófagos	30
1.4.2.- Subconjuntos funcionales de macrófagos	32
2.- Moléculas de la Familia del SLAM	33
2.1.- Genes, expresión y ligandos	33
2.2.- Señalización en la Familia del SLAM	36
2.3.- Función de las moléculas de la familia del SLAM	36
2.3.1.- Función de SLAMF en linfocitos	37
2.3.1.1.- Efectos de la sobre expresión ectópica	39
2.3.1.2.- Experimentos de estimulación con anticuerpos	39
2.3.1.3.- Análisis genéticos de ligación	40
2.3.1.4.- Análisis de ratones genéticamente modificados	41
2.3.2.- Función de SLAMF en células de origen mieloide megacariocito	43
2.4.- SLAMF8	44
3.- NADPH oxidasa y producción de Especies Reactivas de Oxígeno	45
3.1- Tipos de enzimas NOX	46

3.2- NADPH oxidasa de fagocitos	48
3.3- Activación y regulación de la NADPH oxidasa	50
3.3.1- Activación y ensamblaje de la NADPH oxidasa	50
3.3.2.- Rutas de señalización para la activación de la NADPH oxidasa en fagocitos	51
3.3.2.1.- Activación de NADPH oxidasa por la familia de proteína quinasa C	52
3.3.2.2.- Activación de NADPH oxidasa por la ruta Vía de la MAP quinasa p38	53
3.3.2.3.- Implicación de RAC GTPasa en la activación de NADPH oxidasa	54
OBJETIVOS	56
AIMS	58
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1.-Ratones	61
2.- Ratones deficientes en SLAMF8	61
3.- Genotipado de ratones <i>SLAMF8</i> ^{-/-} por PCR genómica	62
4.- Extracción de RNA y RT-PCR	63
5.- Aislamiento de macrófagos peritoneales	65
6.- Obtención de macrófagos de ratón derivados de médula ósea	65
7.- Activación de macrófagos de ratón	66
8.- Aislamiento y Activación de Monocitos humanos	66
9.- Medida de la producción de superóxido en macrófagos	67
10.- Análisis mediante citometría de flujo	68
11.- Fagocitosis de <i>Escherichia coli</i>	70
12.- <i>Western Blot</i>	70
13.- Estudio Translocación de RAC1/2 GTPasa a la membrana	72

14.- Inmunofluorescencia	72
15.- Determinación de la actividad microbicida <i>in vivo</i>	74
16.- Análisis estadístico	74
RESULTADOS	75
1.- Genotipo de los ratones BALB/c <i>SLAMF8</i> ^{-/-}	76
2.- Estudio de la producción de superóxido en ratones <i>SLAMF8</i> ^{-/-}	78
3.- Estudio de las poblaciones peritoneales tras inyección con TGC	82
4.- Fagocitosis en macrófagos peritoneales <i>SLAMF8</i> ^{-/-} obtenidos con TCG	84
5.- Expresión de SLAMF1 (CD150) en macrófagos peritoneales de ratón	85
6.- Estudio de las Vías de activación de NADPH oxidasa en macrófagos de ratón procedentes de ratones <i>SLAMF8</i> ^{-/-}	87
6.1.- Estudio de la fosforilación de p47 ^{phox} y p40 ^{phox} por PKC en la activación de la NADPH oxidasa	87
6.2.- Estudio de la fosforilación de p40 ^{phox} en la activación de la NADPH oxidasa	92
6.3.- Activación de la NADPH oxidasa en macrófagos de ratón peritoneales pretratados con IFN γ	96
6.4.- Regulación de SLAMF8 sobre la Vía de Activación de p38 MAPK	101
6.5.- Reclutamiento de las subunidades p47 ^{phox} y p22 ^{phox} de la NADPH oxidasa por Inmunofluorescencia	105
6.6.- Activación de p47 ^{phox} y p38 MAPK en monocitos humanos	112
6.7.- Translocación de RAC a la membrana en macrófagos	116
7.- Determinación de la actividad bactericida <i>in vivo</i>	118
DISCUSIÓN	120
Estudio de la actividad NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales de ratón	122

Estudio de las rutas de activación de la NADPH oxidasa NOX2 en macrófagos peritoneales <i>SLAMF8</i> ^{-/-}	124
Regulación de SLAMF8 sobre la ruta de activación de PKC	124
Regulación de SLAMF8 sobre la ruta de activación de p38 MAPK	127
Regulación de SLAMF8 sobre la movilización de RAC-GTPasas	128
Reclutamiento de las subunidades p47 ^{phox} y p22 ^{phox} de la NADPH oxidasa por Inmunofluorescencia	129
Función de SLAMF8 en monocitos humanos	130
Estudio de la actividad microbicida <i>in vivo</i>	131
Función de SLAMF8 en macrófagos de ratón	132
CONCLUSIONS	134
CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA	138
ANEXO I: Expresión de la proteína inhibidora de apoptosis neuronal, NAIP, en macrófagos y posible intervención de NAIP en las etapas tempranas de la fagocitosis	160
Introducción	161
Objetivos	163
Materiales y métodos	164
1.- Estimulación de THP-1 con PMA y Raw 264.7 con <i>Salmonella</i>	164
2.- Extracción de RNA y RT-PCR	164
3.- Aislamiento y activación de macrófagos humanos	165
4.- Transducción de Hela con NAIP usando adenovirus	166
5.- <i>Western Blot</i>	166
6.- Inmunofluorescencia	168
7.- Obtención de extractos totales, nucleares y mitocondriales	169
8.- Estimulaciones con PMA y bolitas de látex	170
Resultados	171

1.- Expresión de NAIP en macrófagos activados con diferentes estímulos ..	171
2.- Caracterización del anticuerpo frente a NAIP utilizado	173
3.- Localización subcelular de NAIP	175
4.- Papel de NAIP en la fagocitosis	181
Discusión	185
Expresión de NAIP en macrófagos activados con diferentes estímulos	185
Caracterización del anticuerpo utilizado en la detección de NAIP	185
Localización subcelular de NAIP	186
Papel de NAIP en la fagocitosis	188
Conclusiones	189
Bibliografía	190

SUMMARY

SLAMF8 is a member of the SLAM family recently described. This group of molecules is involved in innate and specific immune response and they participate in a variety of roles in cells in which they are expressed. Thus, these molecules act as co-receptors in the intracellular signal transmission in T and NK cells, modulate different cellular mechanisms, are receptors for pathogenic microorganisms and even recent studies attribute a role in the hematopoietic lineage differentiation [5-11].

The reported work analyzes the role of SLAMF8 in macrophages (MΦ) during activation, in particular, the effect of the lack of SLAMF8 in NADPH oxidase activity. In addition, we investigated the molecular mechanisms by which SLAMF8 regulates this activity, identifying the main pathways that are involved in such a modulation.

In vitro analysis of NADPH oxidase activity, using TGC-elicited mouse peritoneal MΦ as a cellular model, showed an increased production of superoxide ($O_2^{\bullet-}$) in MΦ *SLAMF8*^{-/-} respect to wild type (WT) MΦ in response to PMA and *E. coli*. Furthermore, by confocal microscopy can be observed that the recruitment of p47^{phox} and p22^{phox} subunits, cytosolic and membrane components respectively of NADPH oxidase, occurred more rapidly at short times upon stimulation with PMA and *E. coli* of MΦ. This data placed p47^{phox} recruiting to the phagosome membrane before vesicle fusion to the phagosome (p22^{phox}) which occurs prior to NADPH oxidase activation. These results suggest that the increased vesicle fusion containing NADPH oxidase, in PMA or *E. coli* stimulated MΦ *SLAMF8*^{-/-}, contribute to a more effective NADPH oxidase activation and thus increased production of $O_2^{\bullet-}$ [12-14].

Since phosphorylation and assembly of the of the NADPH oxidase subunits are key to activation of this complex, and this mechanism seems to be regulated by different kinases, including protein kinase include C (PKC), PI3K and p38 MAP kinase [15-19], p40^{phox} and p47^{phox} phosphorylation was analyzed. Using an antibody developed against phosphorylated serine motif by PKC, an increased phosphorylation of both subunits was determined in the peritoneal MΦ *SLAMF8*^{-/-} compared to WT MΦ upon PMA, LPS and bacteria stimulation. LPS and bacteria stimulations were milder suggesting a role of PKC less important in NADPH oxidase activation with these stimuli. This effect was reproducible in PMA stimulated bone marrow-derived macrophages (BMMO).

To study whether the p38 MAPK pathway was modified in peritoneal MΦ *SLAMF8*^{-/-}, the amount of phosphorylated p38 MAPK was analyzed by western blot. The absent of SLAMF8 led to showed an increased phosphorylated p38 MAPK in MΦ *SLAMF8*^{-/-} compared to

WT MΦ upon PMA stimulation. This increased p38 MAPK activation, associated with an increase phosphorylation enzyme was confirmed upon LPS, *E. coli* and *S. aureus* stimulation.

As mentioned above, RAC is another control point in NADPH oxidase regulation. RAC mobilization from the cytoplasm to the membrane was studied by western blot, it was found that RAC translocation was faster and more intense in PMA stimulated peritoneal MΦ *SLAMF8*^{-/-} compared to MΦ WT.

To confirm whether the regulatory role of SLAMF8 in NADPH oxidase also occurred in human, NADPH oxidase activation in PMA stimulated human peripheral blood monocytes (Mo), previously incubated with IFN γ , was studied by western blot. Phosphorylated p47^{phox} subunit account by PKC was greater when IFN γ -induced SLAMF8 upregulated [20], confirming the observed results in SLAMF8 knockout mouse peritoneal MΦ with an enhanced phosphorylation of p47phox and p40phox. These data suggest that SLAMF8 also has a regulatory function in human peripheral blood Mo, as occurs in mouse peritoneal MΦ. Furthermore, we examined p38 MAPK activity in human peripheral blood Mo by western blot, and then we found that PMA stimulated Mo, previously treated with IFN γ , showed increased phosphorylated p38 MAPK compared to no treated Mo. In conclusion, SLAMF8 seems to have a regulatory role in NADPH oxidase in human peripheral blood Mo equivalent to observed data in TGC-elicited mouse peritoneal MΦ.

Taken together, this results obtained in the peritoneal MΦ *SLAMF8*^{-/-}, which have a higher NADPH oxidase activity and then an increased production O₂^{•-}, and since the production of ROS is essential for efficient removal of bacteria, we studied whether SLAMF8 knockout mice showed impaired microbicidal capacity compared to WT mice.

We tested bactericidal activity of BALB/c *SLAMF8*^{-/-} in an assay based on the survival of infected mouse with an attenuated strain of *Salmonella*. We found that the microbicidal capability of SLAMF8 knockout mouse proved more efficient against *Salmonella* than WT mice. These results are consistent with the fact that MΦ *SLAMF8*^{-/-} have enhanced NADPH oxidase activity. Also, *in vitro* tests showed that peritoneal MΦ *SLAMF8*^{-/-} showed no impaired phagocytic activity, showing the same ability to phagocyte *E. coli* and *S. aureus* that WT MΦ.

This data confirm that SLAMF8 acts as a negative regulator of NADPH oxidase modulating the key regulatory pathways of this enzyme, PKC, p38 MAPK and RAC. Moreover, SLAMF8 may be involved in the fusion of vesicles containing NADPH oxidase, contributing to a more effective NADPH oxidase activation and thus increasing production of O₂^{•-}.

RESUMEN

SLAMF8 es uno de los miembros de la familia del SLAM descrito más recientemente. Este grupo de moléculas participan en la respuesta inmunitaria innata y específica desempeñando diversas funciones en las células en las cuales se expresa. Así, estas moléculas actúan como correceptores en la transmisión de la señal intracelular en células T y NK, modulan distintos mecanismos celulares, son receptores de microorganismos patógenos e incluso recientes estudios atribuyen un papel en la diferenciación en el linaje hematopoyético [5-11].

El trabajo presentado analiza el papel que desempeña SLAMF8 en el macrófago (MΦ) durante la activación del fagocito, y en concreto, el efecto que tiene la falta de SLAMF8 sobre la actividad de la NADPH oxidasa. Además, se investigan los mecanismos moleculares por los que SLAMF8 regula tal efecto, identificando las principales vías que se ven involucradas en dicha modulación.

Un análisis *in vitro* de la actividad de la NADPH oxidasa en MΦ peritoneales de ratón obtenidos con TGC, mostró un aumento en la producción de ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en los MΦ de ratones *SLAMF8*^{-/-} respecto a los salvajes (WT) en respuesta a PMA y *E. coli*. Por otro lado, mediante microscopía confocal se pudo observar que el reclutamiento de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox}, componente citosólico y de membrana respectivamente de la NADPH oxidasa, ocurría más rápidamente a tiempos cortos tras la estimulación del MΦ con PMA y *E. coli*. Este dato situó el reclutamiento de p47^{phox} a la membrana del fagosoma antes que la fusión de las vesículas al fagosoma (determinado por p22^{phox}) que se produce previamente a la activación de la NADPH oxidasa. Estos resultados sugieren que el aumento en la fusión de vesículas que contienen NADPH oxidasa en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} estimulados con PMA o *E. coli* contribuiría a una activación más efectiva de la NADPH oxidasa y por tanto a una mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ [12-14].

Dado que el proceso de fosforilación y ensamblaje de las subunidades de la NADPH oxidasa son clave para la activación de este complejo, y este mecanismo parece estar regulado por diferentes quinasas, entre las destacan la proteína quinasa C (PKC), PI3K y p38 MAP quinasa [15-19], se analizó la fosforilación de p40^{phox} y p47^{phox}. Con el uso de un anticuerpo desarrollado frente a motivos de serina fosforilados por la PKC, se pudo determinar una mayor fosforilación de ambas subunidades en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} al ser comparados con los MΦ WT tras ser estimulados con PMA, LPS y bacteria. Las activaciones con LPS y bacteria resultaron ser más leves sugiriendo un papel de la PKC menos importante en la activación de la

NADPH oxidasa con estos estímulos. Este efecto fue reproducible en BMMO estimulados con PMA.

Para estudiar si la ruta de la p38 MAPK estaba modificada en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} se analizó, mediante *western blot*, la cantidad de p38 MAPK fosforilada. Los MΦ deficientes en *SLAMF8* mostraron más cantidad de p38 MAPK fosforilada en comparación con los MΦ WT tras estimular con PMA. Esta mayor activación de la p38 MAPK, asociada a un incremento en la fosforilación, se confirmó tras estimular con LPS y bacteria, *E. coli* y *S. aureus*.

Como se ha mencionado anteriormente, RAC constituye otro punto de control en la regulación de la NADPH oxidasa. Al estudiar por *western blot* la movilización de RAC desde el citoplasma hacia la membrana, ésta resultó ser más rápida y de mayor intensidad en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} en comparación con los MΦ procedentes de ratones WT.

Para confirmar si el papel regulador sobre la NADPH oxidasa de *SLAMF8* se producía también en humano, se estudió, por *western blot*, la activación de la NADPH oxidasa a través de la subunidad citosólica p47^{phox} fosforilada vía PKC en Mo humanos de sangre periférica estimulados con PMA e incubados previamente con IFN γ . La fosforilación de esta subunidad fue mayor cuando se aumenta la expresión de *SLAMF8* inducida por el IFN γ [20], confirmando los resultados observados en MΦ peritoneales de ratón en los que la ausencia de *SLAMF8* conllevaba un aumento en la fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox}. Estos datos sugieren que *SLAMF8* ejerce también un papel regulador en Mo humanos de sangre periférica, al igual que ocurre en los MΦ peritoneales de ratón. Por otro lado, al examinar la actividad de la quinasa p38 MAPK en los Mo humanos de sangre periférica por *western blot*, pudimos comprobar que estos Mo estimulados con PMA, previamente tratados con IFN γ , muestran una mayor fosforilación de la p38 MAPK respecto a los Mo sin tratar con IFN γ . En conclusión, *SLAMF8* parece tener una función reguladora sobre la NADPH oxidasa en los Mo humanos de sangre periférica equivalente a la observada por este grupo en los MΦ peritoneales de ratón.

Dado los resultados obtenidos por nuestro grupo en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-}, los cuales presentan una mayor activación de la NADPH oxidasa y como resultado una mayor producción de O₂^{•-}, y puesto que la producción de ROS es esencial para una eliminación eficiente de bacteria, se estudió si los ratones deficientes en *SLAMF8* presentaban la capacidad microbicida alterada en comparación con los ratones WT.

Al analizar la actividad bactericida de los ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} en un ensayo basado en la supervivencia de una cepa atenuada de *Salmonella* en el ratón, obtuvimos que la

capacidad microbicida del ratón deficiente en SLAMF8 resultó ser más eficiente frente a *Salmonella* que los ratones WT. Estos resultados son coherentes con el hecho de que los MΦ *SLAMF8*^{-/-} tienen aumentada la actividad NADPH oxidasa. Además, ensayos *in vitro*, demostraron que los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} no presentaban alterada la actividad fagocítica, mostrando la misma capacidad de fagocitosis de *E. coli* y *S. aureus* que los MΦ WT.

Tomando todos los datos obtenidos en esta tesis se puede concluir que SLAMF8 actúa como regulador negativo de la NADPH oxidasa actuando sobre las principales vías de regulación de dicha enzima, PKC, p38 MAPK y RAC. Por otra parte, SLAMF8 podría estar participando en la fusión de vesículas que contienen NADPH oxidasa, contribuyendo a una activación más efectiva de la NADPH oxidasa y por tanto a una mayor producción de O₂^{•-}.

ABREVIATURAS

3BP2: Proteína 2 de unión a Abl-SH3 (*Abl-SH3 binding protein 2*)

ADCC: Citotoxicidad mediada por Células Dependientes de Anticuerpos (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)

APC: Célula Presentadora de Antígeno (*Antigen Presenting Cell*)

BLAME: *B Lymphocyte Activator macrophage expressed*

BSA: Albumina de Suero Bovino (*bovine serum albumin*)

CBL: Linfoma de linaje B-casitas (*Casitas B-lineage Lymphoma*)

CCR2: Receptor de quimioquinas CC-2 (*Chemokine Receptor type 2*)

CD: Clúster de Diferenciación (*Cluster of Differentiation number*)

CD4 T: Células T CD4 seleccionadas por Timocitos (*thymocyte-selected CD4 T cells*)

CDP: Célula Progenitora Común de CD (*Common Dendritic Cell Progenitors*)

CFU-M: Unidades Formadoras de Colonias Mieloides (*Colony-forming Unit-Macrophage*)

CSF: Factor Estimulante de Colonias (*Colony-stimulating Factor*)

CSF1: Factor 1 estimulante de colonias en MΦ (*Colony-stimulating Factor 1*)

CSK: Quinasa Src COOH-terminal (*COOH-terminal Src kinase*)

DC: Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

Dok1/2: Proteína de acoplamiento 1/2 (*Docking protein 1/2*)

EAT-2: Transcrito 2 EWS/FLI1 del sarcoma de Ewing (*Ewing's sarcomas EWS/FLI1 Activated Transcript-2*)

EPO: peroxidasa de eosinófilos (*Eosinophil Peroxidase*)

ERT: Transductor relacionado con EAT-2 (*EAT-2-related transducer*)

FACS: Citometría de Flujo (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FimH: Lectina expresada por *Escherichia coli* (tipo 1 fimbriada) (*lectin expressed by (type 1 fimbriated) Escherichia coli*)

fMLP: Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (*Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*)

GC: Centro Germinal (*Germinal Center*)

GFP: Proteína verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GPI: Glicosil-Fosfatidil-Inositol (*Glycosyl-phosphatidyl-inisitol*)

Grb-2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (*Growth factor receptor-bound protein 2*)

H: Hemaglutinina (*Hemagglutinin*)

HSC: Células Madre Hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*)

iELs: Linfocitos Intraepiteliales (*Intraepithelial Lymphocytes*)

IFN: Interferón (*Interferon*)

IL: Interleuquina (*Interleucina*)

iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico inducible (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)

ITSM: (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*)

LAK: Células NK estimuladas con Linfoquina (*Lymphokine-activated Killer Cells*)

LAT: Enlazador de células T activadas (*linker for activated T cells*)

LES: Lupus Eritematoso Sistémico (*Systemic lupus erythematosus, SLE*)

LPS: Lipopolisacárico (*Lipopolysaccharide*)

MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (*Mitogen-activated protein kinases*)

MDP: Progenitor Mieloide (*Monocyte and Dendritic Cell Progenitor*)

MDSCs: Células Supresoras de Origen Mieloide (*Myeloid-derived Suppressor Cells*)

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

Mo: Monocitos (*Monocyte*)

MPO: Mieloperoxidasa (*Myeloperoxidase*)

MPP: Progenitores Hematopoyéticos Multipotenciales (*Multipotent Hematopoietic Progenitors*)

MΦ: Macrófagos (*Macrophage*)

NADPH: Nicotidamina Adenina Dinucleotido Fosfato (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NF-κB: potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK: Células Asesinas Naturales (*Natural Killer cells*)

NOD: Diabetes Autoinmune tipo I (*nonobese diabetes*)

Omp: Proteína de la membrana externa (*Outer membrane protein*)

PD-1: Muerte Programada 1 (*Programmed Death 1*)

PFA: Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)

PHA: Fitohemaglutinina (*Phytohaemagglutinin*)

PI3K: Fosfo-Inositol-3-quinasa (*Phosphatidylinositide 3-kinase*)

PKC: Proteín Quinasa C (*Protein kinase C*)

PLCγ: fosfolipasa Cγ (*Phospholipase Cγ*)

PMA: Acetato miristato de formol (*Phorbol myristate acetate*)

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

SAP: Proteína Asociada a SLAM (*SLAM associated protein*)

SHC: Dominio de Homología Src tipo 2 (*Src homology 2 domain containing*)

SHIP: Inositol Polifosfato 5-fosfatasa que contiene SH2 (*SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase*)

SHP-1/2: fosfatasa 1/2 que contiene SH2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2*)

SLAM: Molécula transmisora de Señales de la Activación Linfocítica (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*)

SLAMF8^{-/-}: Deficiente en SLAMF8 (*SLAMF8 knockout*)

SPF: Condiciones Libres de Patógenos (*Specific Pathogens Free*)

TAMs: Macrófagos Asociados a Tumores (*Tumor-Associated Macrophages*)

TCR: Receptor de Células T (*T Cell Receptor*)

TFH: célula Th folicular (*T Follicular Helper cell*)

TGC: Tioglicolato (*Thioglycolate*)

TIP-DCs: Células Dendríticas productoras de TNF y NO (*TNF and NO producing Dendritic Cells*)

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)

Treg: Células T reguladoras (*Regulatory T Cells*)

TT: Toxide Tetánico (*Tetanus Toxoid*)

UFC: unidades formadoras de colonias (*Colony Forming Unit*)

WT: Salvaje (*Wild Type*)

INTRODUCCIÓN

El biólogo ruso Ilyá Mechnikov (1845-1916) fue el primero en describir la fagocitosis como uno de los mecanismos de defensa del organismo y en exponer la teoría de la inmunidad celular como mecanismo necesario en la respuesta inmunitaria. Además fue el primero en adjudicar a los macrófagos (MΦ) una función en el mantenimiento de la homeostasis e implicarlos junto a los polimorfonucleares en la defensa innata frente a microorganismos. Obtuvo el premio Nobel de Fisiología y Medicina en los inicios del siglo XX (1908) por la exposición de sus teorías junto a Paul Ehrlich (1854-1915), defensor de la inmunidad humoral como el principal mecanismo de defensa. Admitía así la academia sueca ante la comunidad científica la importancia de la inmunidad celular, hecho que sirvió además para conciliar escuelas [21].

Los macrófagos fueron las primeras células del organismo a las que se les adjudicó una función en la defensa inmunitaria, eliminando o “digiriendo” microorganismos fagocitados. Se describieron como células grandes procedentes de la diferenciación de los monocitos (Mo) en diferentes tejidos. Monocitos y MΦ fueron posteriormente adscritos como el sistema fagocítico mononuclear. Se estableció que los Mo son células circulantes que, en los tejidos alcanzan un estado diferenciado permanente cuya principal función es la fagocitosis. Actualmente se sabe que hay distintas subpoblaciones de ambos tipos celulares y que además participan en la respuesta inmunitaria específica activando otras células y presentando el antígeno a los linfocitos T. Por otra parte, se sabe que los macrófagos tienen una función vital en el manteniendo de la homeostasis del organismo de manera independiente a otras funciones o células inmunológicas, como reciclaje y eliminación de eritrocitos, eliminación de células apoptóticas o restos celulares [21, 22].

Las células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*) fueron descritas con posterioridad por presentar características comunes con Mo y MΦ, y forman parte del sistema fagocítico nuclear. Las células dendríticas se describen como distintivas y en general como las células presentadoras de antígenos por excelencia o “profesionales”. Los monocitos, MΦ y DC son, por tanto, células esenciales en la respuesta inmunitaria que comparten una serie de características, en mayor o menor grado, como ser mononucleares, diferenciarse a partir de un progenitor mielomonocítico común, tener capacidad fagocítica, ser importantes productoras de citoquinas y poseer capacidad para presentar antígenos. Las distintas subpoblaciones de cada uno de estos tipos celulares se distinguen por su función, diferenciación o localización, dependiendo de las condiciones fisiológicas ambientales.

En este capítulo se describirán las características diferenciales de Mo y MΦ, células en las que se centra este trabajo, así como funciones y mecanismos de acción en comparación con otros linajes hematopoyéticos. La parte final dedicará una sección a la descripción del complejo NADPH oxidasa y a las vías de activación de este enzima. Finalmente, se expondrán las características de las moléculas de la familia del SLAM centrándonos en su función en células no linfoides, en concreto se describirá la molécula SLAMF8, objeto de estudio en este trabajo.

1.- Monocitos y macrófagos.

1.1.- Descripción morfológica.

En humanos, los Mo son leucocitos circulantes que pueden presentar un aspecto redondeado, ovalado o irregular, a causa de la presencia de pseudópodos. Son las células de mayor tamaño entre los leucocitos y su tamaño oscila entre 15 y 30 μm . El núcleo tiene una localización central y puede ser redondeado, ovalado, arriñonado o con forma de herradura. Su relación núcleo/citoplasma es variable lo que hace que a veces los Mo sean difíciles de distinguir de otros leucocitos. La cromatina es laxa y se dispone formando hileras. El citoplasma suele presentar vacuolas fagocíticas y se tiñe con eosina/hemoxilina en tonos azul-grisáceo con pequeñas granulaciones azurófilas que se tiñen en tonos rojo-púrpura. En la sangre de un adulto sano habría alrededor de 5 billones de células en un volumen de 5L; 450 Mo/ μl [23, 24].

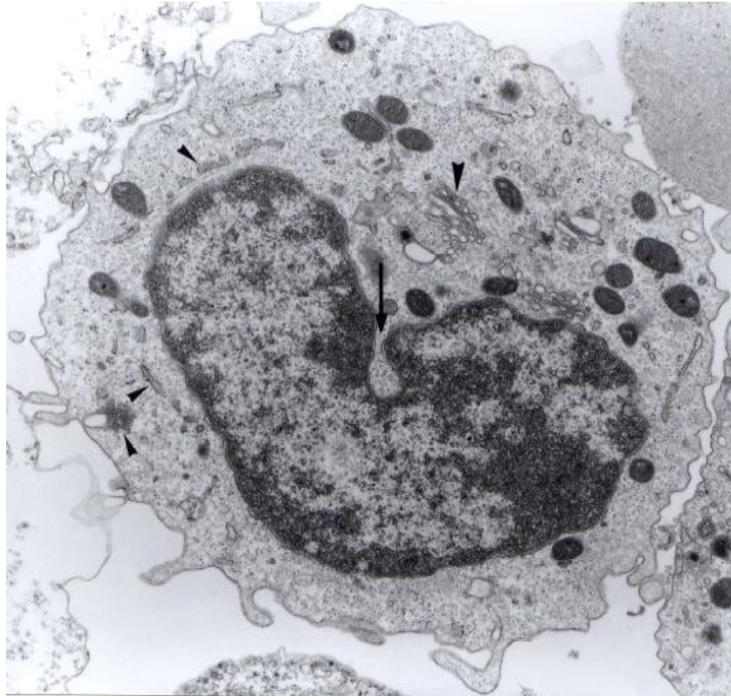


Imagen 1 | **Fotografía electrónica de un monocito.** Monocito con el aspecto característico de la hendidura del núcleo y de algunos elementos citoplasmáticos como aparato de Golgi, mitocondrias y distintos tipos de granulos. Fotografía tomada en microscopio electrónico, aumentos originales 10.000X (Cedido por Ana Abadía).

1.2.- Origen y diferenciación de monocitos y macrófagos.

Los monocitos se consideraban células transicionales con un fenotipo que depende del ambiente en el que se localizan. Clásicamente se han descrito como células de origen mieloide que circulan por el torrente sanguíneo hasta que pasan a los tejidos diferenciándose a MΦ como un estado último de diferenciación. Sin embargo, hoy en día se sabe que algunos Mo pueden quedar en un estado intermedio de diferenciación. Estos monocitos estarían ejerciendo funciones importantes como participar en el remodelado del tejido o bien en respuestas inmunitarias. Así, los Mo son funcionalmente heterogéneos y no necesitan diferenciarse a MΦ o DC para participar en la inmunidad [23, 24].

Hasta el momento se describen, al menos, tres tipos de Mo en humano y dos en ratón. Éstos pueden diferenciarse, además, a MΦ o DC dependiendo de las circunstancias. [25, 26].

En ratón, las células mieloides proceden de las células madre hematopoyéticas (unidades formadoras de colonias mieloides, CFU-M; *Colony-forming Unit-Macrophage*) de

médula ósea del adulto o del saco de la yema del embrión en desarrollo. En la médula ósea, los Mo, tanto humanos como de ratón, se desarrollan a partir de un progenitor mielóide (*Monocyte and Dendritic Cell Progenitor*, MDP) a DC y MΦ, dependientes del factor 1 estimulante de colonias de MΦ (CSF1, *Colony-stimulating Factor 1*), el cual también da lugar a la célula progenitora común de DC (*Common Dendritic Cell Progenitors*, CDP). Los progenitores MDP dan lugar a Mo que expresan característicamente la lectina LY6C^{hi} en ratón, o CD14^{+/-} CD16^{+/-} en humano, que salen de la médula ósea dependientes del receptor de quimioquinas CC-2 (CCR2) y que son reclutados desde la sangre a los tejidos inflamados. Aquí, pueden diferenciarse en células dendríticas productoras de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*), también denominadas TIP-DCs (*TNF and NO producing Dendritic Cells*), MΦ inflamatorios o DC inflamatorias, algunas de las cuales posteriormente pueden migrar a los ganglios linfáticos de drenaje [8]. Los macrófagos inflamatorios, dependiendo del ambiente inflamatorio, pueden polarizar en fenotipos específicos, tales como MΦ M1 o M2, de los que hablaremos más adelante. Otra población de Mo recientemente descrita se caracteriza por la expresión de LY6C^{low}. Éstos proceden de los Mo LY6C^{hi} y se ha descrito que patrullan el lumen de los vasos sanguíneos mediante la asociación con el endotelio vascular [27] para ser reclutados a los sitios de inflamación y, posiblemente, contribuir a la reparación de heridas por la diferenciación a MΦ activados por la vía alternativa (M2).

En ausencia de inflamación, algunos Mo circulantes LY6C^{hi} pueden volver a la médula ósea. En ratón el bazo funciona, además, como un depósito de Mo fuera de la médula ósea. Tras un infarto de miocardio, los Mo son liberados de los depósitos esplénicos, y los Mo LY6C^{hi} son selectivamente reclutados en el corazón herido [27].

1.3.- Subpoblaciones de monocitos y su función.

1.3.1.- Monocitos en ratón.

Los monocitos en el ratón representan alrededor del 1,5 % del total de leucocitos de sangre periférica, es decir, aproximadamente 100 células/ μ l de sangre. Esta escasez combinada con la dificultad de mantenerlos en cultivo hace que sea difícil su estudio.

En 2003, Geissmann y colaboradores (col.) [28] describieron el fenotipo y la relevancia funcional de los subgrupos de Mo. Según esta clasificación, existe un subgrupo principal que engloba los denominados Mo “inflamatorios”, LY6C^{high}Gr-1⁺X₃CR1^{low}CCR2^{high}CD62L⁺, que tienen una vida media relativamente corta y que migran hacia los tejidos inflamados. Estos Mo representan aproximadamente el 2-5 % de los leucocitos circulantes en un ratón no infectado y son rápidamente reclutados a los sitios de infección e inflamación [29]. La expresión del CCR2 en los Mo Ly6c^{high} determina el destino hacia el foco inflamatorio de esta población. De hecho, en ratones con deficiencia de CCR2 se reduce notablemente el tráfico de los Mo LY6C^{hi} a los sitios de inflamación, lo que indica un papel crucial de este receptor de quimioquinas en el tráfico de estos Mo [30, 31]. El CCR2 se expresa también en las células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) y en un subconjunto de células asesinas naturales (NK). El reclutamiento de las HSC mediado por CCR2 contribuye a la generación de las poblaciones de Mo inflamatorios durante la peritonitis y la hepatitis inducida por acetaminofeno [32].

El segundo subgrupo, LY6C^{low}Gr-1CX₃CR1^{high}CCR2^{low/neg}CD62L^{neg}, son células de menor tamaño, y se encuentran en el tejido inflamado y no inflamado. En el torrente sanguíneo, estos Mo también denominados “reparadores” son menos frecuentes que los Mo LY6C^{hi}. Se adhieren y migran a lo largo de la superficie luminal de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos pequeños en un proceso denominado patrullaje [33].

Tabla 1 | **Subpoblaciones de monocitos humanos y de ratón.**

Subpoblación	Marcador	Receptores de Quimioquinas	Funciones
Ratón			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Funciones proinflamatorias [28] y antimicrobianas [29]
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{lo} _w	CX3CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrullaje [33]; respuestas tempranas [33]; reparación de tejidos [34]
Humano			
Clásico	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Similar a Mo LY6C ^{hi} según <i>arrays</i> de expresión de genes [28, 35, 36]
Intermedio	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX3CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Funciones proinflamatorias [37, 38]
No-clásico	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CX3CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrullaje [39]; papel antiviral [39]

Shi, C. and Pamer, E. G, 2011 [27]

1.3.2.- Monocitos en humano.

Los monocitos se consideran clásicamente células de transición, cuya principal función es la de repoblar las diferentes poblaciones de MΦ de tejido [23, 24]. No obstante, numerosos estudios realizados desde la década de los 80s postulan la existencia de una heterogeneidad morfológica y funcional de los Mo humanos. Actualmente, en sangre se describen tres poblaciones de Mo humanos. Existe un subgrupo "clásico" predominante constituido por células que expresan el correceptor CD14 del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas. Estas células son fagocíticas, productoras de citoquinas inflamatorias, IL-1 e IL-6, y factor estimulante de colonias (CSF, *Colony-stimulating Factor*), con una alta actividad mieloperoxidasa (*Myeloperoxidase*, MPO) y alta citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las otras dos subpoblaciones están constituidas por subgrupos más reducidos de células las cuales son menos fagocíticas, expresan niveles más bajos de CD14 y niveles más altos de HLA-DR, producen altos niveles de IFN- α , y muestran una mayor capacidad de presentar el toxoide soluble tetánico (TT) y los antígenos [40-47].

Al estudiar la expresión de Fc γ R-III (CD16) [48, 49] se observó que la mayoría de los Mo eran células CD16⁻, tenían una baja expresión de HLA-DR, eran altamente fagocíticas e inflamatorias, y expresaban el receptor de quimioquinas CCR2. Éstos son los llamados clásicos y constituyen el 85 % de los Mo en sangre. El subgrupo minoritario (15 %) estaba constituido por células CD16⁺, HLA-DR⁺, CCR2⁻ y CCR5⁺. Puesto que los Mo CD16⁻ en determinadas situaciones pueden expresar CD16 y dado que los MΦ expresan CD16, se postuló que el subgrupo CD16⁺ era una versión más madura de Mo CD16⁻ [50]. Los monocitos CD16⁺ se denominaron células proinflamatorias, debido a su capacidad de producción de TNF α en respuesta a LPS [38, 51]. Estudios posteriores han demostrado que este subgrupo se puede diferenciar a DC, en respuesta a fractalquina [52-54], y proliferar bajo diferentes situaciones de estrés o condiciones de enfermedad [37, 55-58].

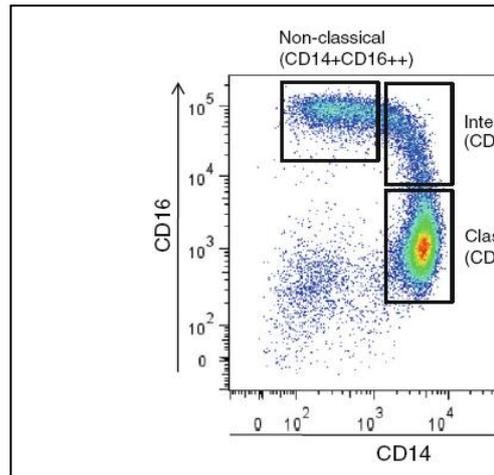


Imagen 2 | Citograma de monocitos humanos mostrando la selección de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, Wong y col., 2012 [59].

Grage-Griebenow y col., [60] fueron los primeros en proponer la existencia de al menos tres subgrupos de Mo humanos: el subgrupo $CD14^+CD16^-$ ya descrito previamente, y dos subgrupos que expresan CD16 (imagen 2). La población de Mo $CD16^+$ se compone de Mo $CD14^+CD16^{++}$, los cuales también se les conoce como Mo no clásicos, y $CD14^{++}CD16^+$ o intermedios [61]. El subconjunto $CD14^+CD16^{++}$, en términos de patrullaje *in vivo*, es similar a la población de Mo de ratón $LY6C^{low}$ [39] (tabla 1). La descripción de estas subpoblaciones hace suponer que se podrían distinguir los subgrupos por su fenotipo y funciones, pero los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación son controvertidos. Algunos estudios sobre expresión de RNA en las distintas poblaciones de Mo determinan que los Mo intermedios parecen estar más relacionados con los Mo no clásicos [62, 63]. Otro estudio, sin embargo, relaciona más los Mo clásicos con los intermedios [64]. En cuanto a la producción de citoquinas, también parece haber cierta controversia. Si bien, como se ha descrito antes, se atribuye una alta producción de citoquinas inflamatorias a los Mo clásicos $CD14^{++}CD16^-$, varios artículos describen una alta producción de citoquinas $TNF\alpha$ en los Mo $CD16^+$, pero con diferencias notables entre las mismas, según los autores. Parece ser que las diferencias de producción de citoquinas están más bien relacionadas con la metodología utilizada [64].

El subgrupo de Mo intermedios CD16⁺/CD14⁺⁺ se describen como células con alta capacidad de activación de linfocitos T, presentan alta expresión en HLA-DR y moléculas de procesamiento de antígenos. Está por demostrar su capacidad para el procesamiento del antígeno, que aún no ha sido caracterizada *in vivo* o *in vitro*. Los monocitos CD16⁻ son un subgrupo de células más inflamatorias que los Mo CD16⁺, que expresan CCR2 y MPO a niveles superiores [65]. Fenotípicamente se asemejan a los Mo inflamatorios en ratones [26], aumentan en sangre poco después de un infarto de miocardio [66], e incrementan la expresión de PD-1 (*programmed death 1*), una molécula coestimuladora anti-inflamatoria, algo menos que los Mo CD16⁺ [67]. Aunque los monocitos clásicos son capaces de expresar moléculas MHC II rápidamente e inducir proliferación de células T tras una estimulación adecuada.

1.4.- Subconjuntos de macrófagos y su función.

El sistema fagocítico mononuclear se genera a partir células madre hematopoyéticas comprometidas ubicadas en la médula ósea. Los precursores de los MΦ son liberados en la circulación como Mo, y a los pocos días pasan a los tejidos de todo el organismo, incluyendo el bazo, que sirve como un reservorio de almacenamiento de Mo inmaduros [3]. Los monocitos se extravasan del torrente sanguíneo a los tejidos a través del endotelio y se diferencian a MΦ o DC. Por lo tanto, una de las funciones principales de los Mo es ser progenitores de los MΦ residentes de tejidos y DC en estado estacionario y en respuesta a la inflamación. Los monocitos, las DC y los MΦ, junto con los neutrófilos y los mastocitos, son las denominadas células fagocíticas "profesionales" que se distinguen de los "no profesionales" por su efectividad en la fagocitosis [24].

Los macrófagos suelen distinguirse de las DC por una expresión diferencial de receptores de superficie, tales como F4/80, CD11b y CD18 (MAC1), CD68 y los receptores Fc. Sin embargo, actualmente existen pocas combinaciones de marcadores que puedan separar claramente a los MΦ de las DC mieloides debido a que estas poblaciones están en continuo desarrollo a partir de progenitores mieloides comunes (Tabla 2).

Tabla 2 | Principales marcadores de membrana expresados en Mo y MΦ humanos y ratón.

Nombre Común	Gen	Comentario
CD11b	Itgam	Expresado en todas las células de origen mieloide.
F4/80	Emr1	Expresado en la mayoría de los MΦ tisulares en ratón. Descenso de expresión regulada por diferentes factores incluyendo IFNγ [68]. En humanos, expresado principalmente en neutrófilos [69].
CD68	CD68	Expresado en todos los MΦ. Relacionado con el “homing” en humano y fagocitosis en ratón.
CSF1R	Csf1r	Expresado en todas las células monocíticas, incluidos MΦ y osteoclastos.
MAC2 (galectina 3)	Lgals3	Se une a galactosa e IgE.
CD11c	Itgax	Expresado en muchas células derivadas de las monocíticas, incluyendo MΦ. Enriquecida en ciertas poblaciones de DC.
LY6G	Ly6g	Enriquecida en granulocitos. Utilizado frecuentemente junto con LY6C para determinar la cantidad relativa de granulocitos y Mo o MΦ.
LY6C	Ly6c1	Enriquecido en células de linaje mielo-monocito.
IL-4Rα (CD 124)	Il-4ra	Expresado en la mayoría de MΦ aunque también en linfocitos y otros tipos celulares que responden a IL-4 e IL-13. Implicado en la diferenciación Th2 y regula la producción de IgE.
CD163	CD163	Expresado en la mayoría de los MΦ tisulares. Receptor “scavenger” o depuradores.

Murray, P. J. and Wynn, T. A., 2011 [3]

1.4.1.- Distribución tisular de los macrófagos.

Los macrófagos están divididos en subpoblaciones en función de su localización y su fenotipo funcional [26] (figura 1). Existen macrófagos específicos residentes en el tejido como los osteoclastos (hueso), los MΦ alveolares (pulmón), histiocitos (tejido conectivo intersticial) y las células de Kupffer (hígado). El intestino está poblado con varios tipos de MΦ y DC que tienen distintos fenotipos y funciones, pero que cooperan para mantener la tolerancia frente a la flora intestinal y los alimentos. Los órganos linfoides secundarios también tienen distintas poblaciones de MΦ que realizan funciones específicas. Un ejemplo de ello son los MΦ de la zona marginal del bazo, que suprimen la inmunidad innata y adaptativa de las células apoptóticas [70], o bien, los MΦ del seno subcapsular de los ganglios linfáticos que eliminan los virus de la linfa e inician la respuesta inmunológica humoral antiviral [71, 72]. Existen distintas subpoblaciones de MΦ que patrullan los llamados “sitios inmunitarios privilegiados”,

tales como el cerebro (microglía), los ojos y los testículos, donde participan en funciones como la remodelación tisular y la homeostasis. Estas subpoblaciones de MΦ específicos de tejido ingieren cuerpos extraños y reclutan MΦ de la circulación durante una infección o después de una lesión.

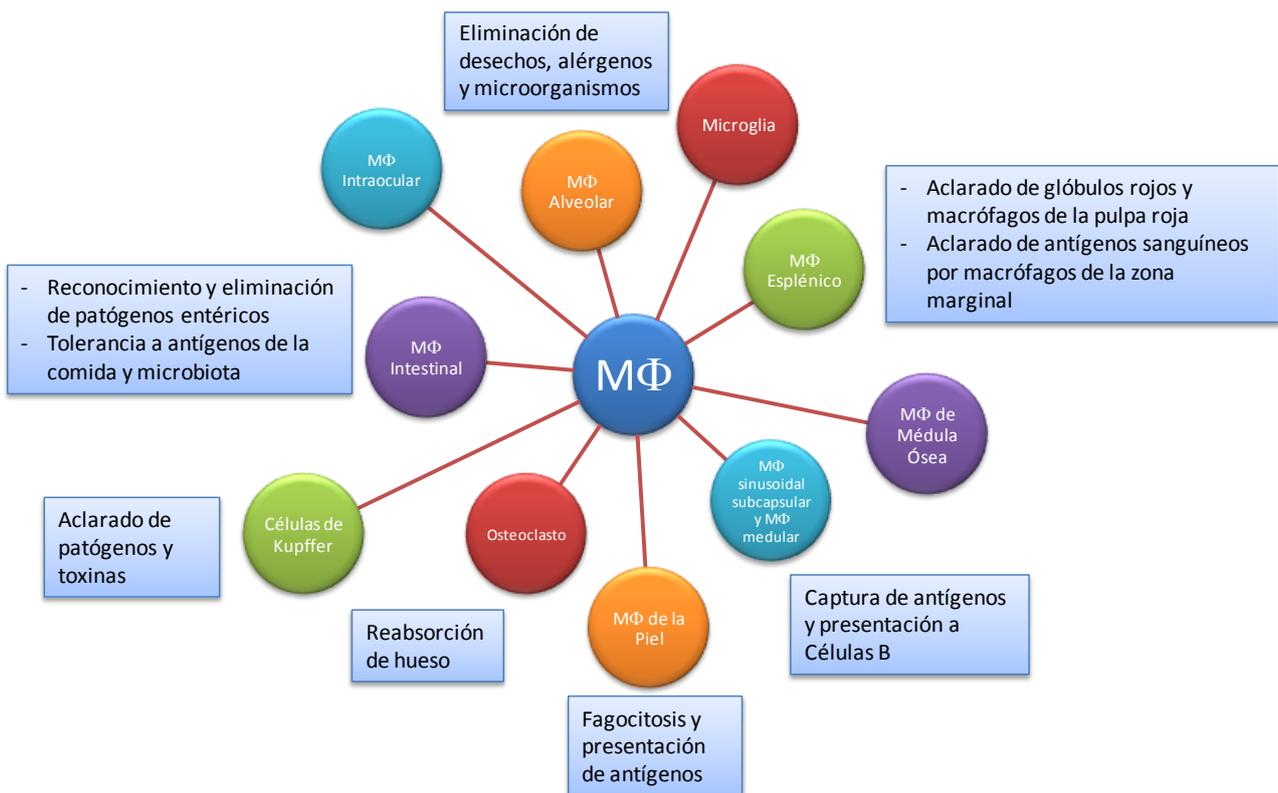


Figura 1 | **Clasificación, distribución y funciones de los macrófagos en los tejidos** [3]. Los fagocitos mononucleares se generan a partir de células madre hematopoyéticas comprometidas, localizadas en la médula ósea. Los precursores de los MΦ se liberan en la circulación como Mo y migran rápidamente en casi todos los tejidos del cuerpo, donde se diferencian a MΦ maduros. Las poblaciones de MΦ tisulares maduros están ubicadas estratégicamente por todo el cuerpo y llevan a cabo actividades de vigilancia inmunológica importantes, incluyendo fagocitosis, la presentación del antígeno y la supresión inmunitaria.

1.4.2.- Subconjuntos funcionales de macrófagos.

Puesto que hay gran coincidencia en la expresión de marcadores de superficie entre las distintas subpoblaciones de MΦ [73], un enfoque útil para la caracterización es cuantificar perfiles de expresión de genes específicos tras la exposición de citoquinas o estimulación microbiana [39]. En base a estos criterios se ha observado que los MΦ presentan una plasticidad y diversidad considerable. Se han descrito varios subconjuntos de MΦ con distintas funciones. Los macrófagos activados clásicamente (MΦ M1) dependientes de IFN γ y asociado a TLR, median en defensa del hospedador frente a una variedad de bacterias, protozoarios y virus, y tienen un papel en la inmunidad antitumoral. Los macrófagos activados de forma alternativa o M2, dependientes de IL-4, IL-13 y en ausencia de IFN γ , tienen una función antiinflamatoria y regulan la cicatrización de heridas y defensa frente a helmintos [74-77]. Podemos distinguir asimismo MΦ "reguladores" que pueden segregar grandes cantidades de interleucina-10 (IL-10) en respuesta a la unión con receptores Fc- γ [78, 79]. Los macrófagos asociados a tumores (*Tumor-Associated Macrophages*, TAMs) suprimen la inmunidad antitumoral, y las células supresoras de origen mieloide (*Myeloid-derived Suppressor Cells*, MDSCs), además están vinculadas a los TAMs y pueden ser sus precursores [80]. Aunque existen diferencias obvias entre los MΦ M2, los MΦ reguladores, los TAMs y el subconjunto MDSC, todos ellos presentan actividad inmunosupresora [74].

La polarización hacia estos tipos de MΦ es similar a la polarización de las células T (Th1, Th2, Treg), inductoras de dicha polarización y caracterizada por un perfil de marcadores moleculares como IRFs, JAK/STAT y factores de transcripción. Así, IL-4 y STAT6 en colaboración con KLF4, un factor característico MΦ, favorecen diferenciación a M2, en la que participan también STAT3 y factores como PARP γ y PARP δ [81, 82]. En cambio, en la diferenciación a M1 participan TLRs, IFN γ y STAT1, que inducen los factores IRF5 e IRF3 característicos en este perfil. Los M1 son a su vez inductores de la diferenciación de Th a Th1 o Th17. Al igual que la diferenciación Th, los factores inductores de una polarización hacia uno de estos tipos de MΦ inhiben la diferenciación hacia el otros perfiles [76]. En consecuencia, cuando son estimulados, los MΦ adoptan fenotipos dependientes del contexto que promueven o inhiben la defensa antimicrobiana del hospedador, la inmunidad antitumoral y la respuesta inflamatoria

En general, los MΦ presentan una amplia gama de fenotipos en lugar de subpoblaciones estables [80]. De hecho, numerosos estudios han documentado la plasticidad

en su programación analizando MΦ que pasan de un fenotipo funcional a otro en respuesta a las señales variables microambientales del entorno local [83-87].

2.- Moléculas de la Familia del SLAM.

Las moléculas de la familia del SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) se describen en un principio como moléculas de adhesión que intervienen en la sinapsis inmunológica de células T con células presentadoras de antígeno (APC) y células NK con la célula diana. Posteriormente se comprobó que los miembros de la familia del SLAM tienen una amplia expresión en todas las células hematopoyéticas aunque finamente restringida, lo que hace sospechar una contribución en funciones particulares de los distintos miembros de esta familia según el ambiente y célula en la que se expresa. La interacción entre estas moléculas con sus respectivos ligandos no solo implica la activación de la célula T descrita inicialmente, sino que modula más mecanismos acompañando a receptores principales, siendo los SLAMF receptores clave en la respuesta inmunitaria innata y específica. Estas funciones dependen de la expresión conjunta en la célula de las proteínas adaptadoras SAP, EAT2 y ERT.

Recientemente se ha descrito además una expresión distintiva de algunos miembros de la familia comprometiendo la diferenciación y linaje de células hematopoyéticas [5, 88]. Por otro lado, CD48 y SLAMF1 se han descrito como receptores de microorganismos expresados en distintas células de origen hematopoyético, ampliando el abanico de funciones en las que pueden participar. En este apartado se comentará de forma amplia las funciones en las que participan los distintos miembros de la familia del SLAM y en concreto de SLAMF8, miembro en el que se centra este trabajo.

2.1.- Genes, expresión y ligandos.

Este grupo de receptores consta de nueve miembros: SLAMF1 (CD150, SLAM), SLAMF2 (CD48, BLAST2), SLAMF3 (CD229, Ly9), SLAMF4 (CD244, 2B4), SLAMF5 (CD84, Ly9B), SLAMF6 o Ly108 en ratón, (SF2000, NTB-A,) (*NK-T- and B-Cells Antigen*), SLAMF7 (CD319, CS1, CRACC -

CD2-Like Receptor Activating Cytotoxic Cell-), SLAMF8 (CD353, BLAME -*B Lymphocyte Activator macrophage expressed-*) y SLAMF9 (CD84-H1, CD2F10, SF2001).

El clúster de los genes que codifican las moléculas de la familia del SLAM se encuentra localizado en el cromosoma humano 1q21-24 y en el ratón en el locus 1 H2. Este hecho y la disposición conservada de intrones y exones en todos los miembros implican que estos receptores surgieron de la duplicación de un gen ancestral. En el genoma humano tiene una localización pericéntrica formando por 7 de los genes de la esta familia y 2 genes adyacentes, SLAMF8 y SLAMF9, localizados en dirección 5' fuera del *locus*. En ratón, el *locus* esta próximo al telómero presentando la misma organización pero con una orientación invertida respecto al humano (figura 2), [5].

Las moléculas de la familia del SLAM presentan una disposición en membrana propia de proteínas transmembrana tipo I, formada por una región amino terminal extracelular, un segmento transmembrana y una región carboxiterminal citoplasmática. La región extracelular está formada por 2 dominios tipo inmunoglobulina (Ig): un dominio tipo variable "V" próximo al grupo amino (NH₂) terminal y un dominio tipo constante "C2" próximo a la membrana, con la excepción de Ly9 (SLAMF3) que tiene dos tándem de dominios Ig "V" y "C2" en la región extracelular. La interacción de las moléculas de la familia del SLAM con su ligando generalmente es homotípica, interaccionando, por tanto, con moléculas del mismo tipo en la sinapsis inmunológica. La interacción también puede ser heterotípica como es el caso de 2B4 (SLAMF4) que interactúa con CD48 (SLAMF2). Este último, a su vez, puede interaccionar con CD2, compitiendo con CD58 en humanos (para este último no se ha descrito homólogo en ratón). Ambas moléculas son importantes también en la sinapsis inmunológica, y aunque son similares en estructura y patrón de expresión a los miembros de la familia del SLAM, no pertenecen a la misma ya que son codificadas en el *locus* de cromosomas distintos, tanto en humano como en ratón. De hecho, en algunos casos, los 11 miembros son referidos como la familia de receptores del CD2/SLAM. El tipo de interacción de los miembros SLAMF8 y SLAMF9 está aún por determinar [89, 90].

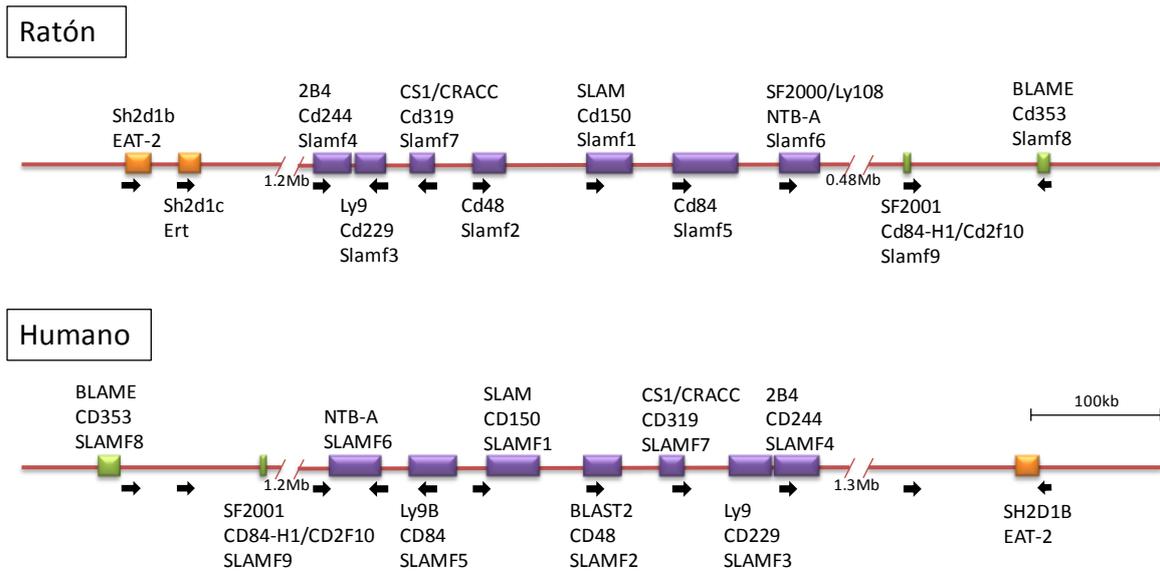


Figura 2 | **Organización genómica del locus de la Familia del SLAM en humano y ratón** [5]. Los genes que codifican los miembros de la Familia del SLAM están localizados en el cromosoma 1q23 en humanos y en el cromosoma 1H2 en ratón. Siete genes pertenecientes a la familia SLAM se agrupan en un segmento genómico de 400 kb, tanto en humano como en ratón. La disposición de estos genes es idéntica en ambos genomas salvo su orientación; los genes en el humano están más próximos del centrómero y en ratón más cerca del telómero. SLAMF8 y SLAMF9, genes que pertenecen también a la familia del SLAM, están situados en la misma región cromosómica pero fuera del locus de SLAM. EAT-2 en humano y, EAT-2a y EAT-2b en ratón, también se encuentran cerca del locus de SLAM. Los cuadrados negros representan bloques de secuencias que contienen un conjunto completo de exones del gen y las flechas indican la dirección de transcripción de estos genes.

Una característica interesante de algunos miembros de esta familia es que son receptores para microorganismos como es el caso de SLAMF1 y CD48 [11, 91]. SLAM, por ejemplo, actuaría como biosensor del virus del sarampión y otros *morbillivirus* [8, 9], y como receptor bacteriano que reconocería proteínas OmpC y OmpE de la membrana externa de bacterias Gram positivas. CD48 es receptor de FimH, una lectina presente en los *pili* de enterobacterias [11].

2.2.- Señalización en la Familia del SLAM.

Las moléculas de la familia del SLAM se asocian por su región citoplasmática con proteínas adaptadoras de la familia SAP (*SLAM associated protein*): SAP, EAT2 y ERT. Estas interacciones son mediadas por los motivos de tirosina de la región citoplasmática característicos de la familia del SLAM, T-I/V-I-X-X-V/I, a través del dominio SH2 de estas proteínas adaptadoras. Estos motivos se han denominado recientemente como motivos ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*, TxYxxV/I), [5, 92].

La mayoría de los dominios SH2 requieren tirosinas fosforiladas para la unión. SAP, en cambio, puede unirse a residuos ITSM próximos a la membrana de la cola citoplasmática de SLAM a través de una estructura (*three-pronged binding mechanism*) que estabiliza la unión a tirosinas no fosforiladas. En contraste con esto, otros miembros de la familia del SLAM sí que requieren la fosforilación en los residuos tirosina de los ITSM como 2B4, NTB-A, Ly108, Ly9 y CD84. Los niveles basales de fosforilación de los receptores de SLAM observados en muchos tipos celulares parecen favorecer el reclutamiento inicial de SAP [64]. CRACC se asocia principalmente a EAT-2 y se une débilmente a SAP. Otros miembros de la familia del SLAM no presentan motivos ITSM como es el caso de SLAMF8, CD84-H1 y CD48. SLAMF8 y CD84-H1 no se asocian a moléculas adaptadoras ya que presentan una cola citoplasmática corta que no contiene motivo alguno característico, aún descrito, de unión a proteínas. El CD48, en cambio, está anclado a la membrana por medio de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) [89]. Moran y col., (1998), describen claramente la asociación de éste receptor en balsas lipídicas, y demuestran la inducción de la fosforilación de Lck posterior a la interacción con su ligando CD2, lo que contribuiría a la señalización a través del TCR mediante fosforilación de CD3 y a la reorganización del citoesqueleto [93].

2.3.- Función de las moléculas de la familia del SLAM.

Las moléculas de la familia del SLAM se expresan en diferentes tipos de células de origen hematopoyético en las que, además de actuar como moléculas de adhesión en la sinapsis inmunológica, ejercen distintas funciones (tabla 3). Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estas moléculas están implicadas en numerosas funciones de tipo

inmunológico en aquellas células en las que se expresan. Parte de estos estudios han demostrado las funciones que ahora vamos a exponer.

2.3.1.- Función de SLAMF en linfocitos.

Dentro de los miembros de la familia el más estudiado es SLAMF1, que se expresa en timocitos, linfocitos T y B, en DC y macrófagos, actuando como activador en todas estas células. Otras moléculas de la familia, como CD84 y Ly9, se proponen como elementos principales en los linfocitos y otros leucocitos, ya que están presentes de forma amplia en distintos momentos de la diferenciación de estas células y en distintos tejidos linfoides, aunque sus funciones no estén bien definidas. Por ejemplo, Ly9 (SLAMF3) se expresa en timocitos y en células T cooperadoras foliculares humanas [94].

Otra propiedad a destacar de algunos de los miembros de la familia del SLAM es que se encuentran en las microbalsas lipídicas (*lipid rafts*) de las células de forma constitutiva. Por ejemplo, CD48 contribuye así a la transmisión de la señal citoplasmática asociado a quinasa Lck en estos microdominios, o 2B4 (SLAMF4) asociado a SAP permite la señalización clásica de la familia [93, 95]. Esta asociación podría darse en aquellos miembros de la familia del SLAM sin motivos citoplasmáticos descritos, aunque es una posibilidad aún pendiente de estudio.

Tabla 3 | Características de los miembros de la Familia del SLAM [5, 89].

Abreviaturas: **DC:** células dendríticas; **FimH:** lectina expresada por *Escherichia coli* (tipo 1 fimbriada); **GC:** centro germinal; **H:** hemaglutinina; **HSCs:** células madre hematopoyéticas; **iELs,** linfocitos intraepiteliales; **MPP:** progenitores hematopoyéticos multipotenciales; **Omp:** proteína de la membrana externa; **SLAM:** signaling lymphocyte activation molecule; **TFH:** célula Th folicular; **3BP2:** Proteína 2 de unión a Abl-SH3; **CBL:** linfoma de linaje B-casitas; **CD4 T:** células T CD4 seleccionadas por timocitos; **CSK:** quinasa Src COOH-terminal; **Dok1/2:** Proteína de acoplamiento 1/2; **EAT-2:** transcrito 2 EWS/FLI1 del sarcoma de Ewing; **ERT:** transductor relacionado con EAT-2; **Grb-2:** proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento; **LAT:** Enlazador de células T activadas; **NF-κB:** potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas; **PI3K:** fosfoinositol 3-quinasa; **PLCγ:** fosfolipasa Cγ; **SAP:** proteína asociada a SLAM; **SHC:** dominio de homología Src tipo 2; **SHIP:** inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene SH2; **SHP-1/2:** fosfatasa 1/2 que contiene SH2.

Receptor	Ligando	Expresión	ITSM	Efectores	Fenotipo del ratón <i>knockout</i>
SLAMF1 SLAM, CD150	SLAM (CD150), Virus del Sarampión (H), OmpC y OmpF de Gram- negativas	HSCs, timocitos (highest DP), Células B, DCs, células T activadas, macrófagos, plaquetas, GC TFH	Humano: 2 Ratón: 2	Timocitos: SAP, Fyn, SHIP, Dok1, Dok2, SHC, Ras-GAP Células T: SAP, Fyn, Akt, PKC θ , NF- κ B, SHP-1, SHP-2 Células B: Fgr/Lyn, SHIP, SHP-2, Akt Plaquetas: SAP Macrófagos: complejo Vps34-Vps15- beclin	Slam ^{-/-} Células T CD4: ↓ producción IL-4 y IL-13, ↑ IFN- γ Células GC TFH: ↓ producción IL-4 macrófagos: ↓ producción NO, IL-12, TNF- α , ↑ producción IL-6, ↓ maduración del fagosoma Plaquetas: ↓ agregación Desarrollo NKT: junto con Ly108
SLAMF2 CD48	CD2, CD244 (2B4), FimH	Células Hematopoyéticas	N. D.	N. D.	Cd48 ^{-/-} Células T: ↓ proliferación y producción IL-2
SLAMF3 Ly9, CD229	Ly9 (CD229)	Timocitos, T, TFH, NKT, B, NK (bajo), macrófagos, DC	Humano: 2 Ratón: 2	Células T: SAP, Fyn, Grb2, μ 2 AP-2, ERK, SHP-2	Ly9 ^{-/-} Células T: ↓ proliferación, ↓ producción IL-4 y IL-2
SLAMF4 2B4 CD244	CD48	MPP, NK, $\gamma\delta$, células T CD8 activadas, iELs CD8, monocitos, basófilos, eosinófilos	Humano: 4 Ratón: 4	Células NK: SAP, EAT-2/ERT, Fyn, LAT Vav1, CBL, PI3K, flujo Ca2+, ERK1/2, 3BP2, CSK, SHP-1, SHP-2, SHIP Células T CD8: SAP	2b4 ^{-/-} Células NK: ↑ citotoxicidad
SLAMF5 CD84	CD84	Células NK, NKT, B, T, monocitos, plaquetas, DC, eosinófilos, neutrófilos, TFH	Humano: 2 Ratón: 2	Células T: SAP Células B: EAT-2, SHP-1, SHP-2	Cd84 ^{-/-} Adhesión de células T-B, desequilibrio GC, ↓ células TFH, ↓ producción IL-21
SLAMF6 (CD352) Humano: NTB-A Ratón: Ly108	Humano: NTB- A Ratón: Ly108	Timocitos (mayor en DP), NK, T, B, DC (bajo), eosinófilos, neutrófilos, TFH	Humano: 2 Ratón: 2	Timocitos: SAP, Fyn, Vav1, CBL Células T: flujo Ca2+, SAP, SHP-1 Células B: flujo Ca2+ Células NK: SAP, SHP-1	Ly108 ^{($\Delta 2+3$)/($\Delta 2+3$) T células: ↓ producción IL-4 Neutrófilos: ↓ producción ROS, ↑ producción IL-12, IL-6, TNF-α, ↓ capacidad eliminación bacteria NKT células: ↓ número células Células T CD4: leve ↓ número células}
SLAMF7 CRACC, CS1, CD319	CRACC (CD319)	Células NK, B, DC, células plasmáticas, Células T CD4 y CD8 activadas	Humano: 1 Ratón: 1	NK células: EAT-2, PLCy1, PLCy2, flujo Ca2+ General: SHP-1, SHP-2, Fyn, SHIP, CSK	Cracc ^{-/-} Células NK: ↓ actividad microbicida, ↓ flujo Ca2+ Células T CD4: ↓ IL-2, ↓ IFN- γ , ↓ proliferación N. D.
SLAMF8 BLAME, CD353	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
SLAMF9 SF2001, CD84-H1	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

2.3.1.1.- Efectos de la sobre-expresión ectópica.

Gran parte de la información sobre la actividad reguladora de receptores relacionados con los miembros de la familia del SLAM se obtuvo a través de estudios en los cuales los ligandos de los receptores de SLAMF fueron ectópicamente expresados en células diana de las células NK. Muchos grupos han descrito que la expresión de CD48, ligando de 2B4, en células diana aumenta la citotoxicidad por células NK humanas [96]. Este efecto también se observó en NTB-A, CRACC y, al menos en ratón, Ly-9 [97-99]. No obstante, otros grupos atribuyen un papel inhibitorio a 2B4 en células NK de ratón; dos grupos encontraron que la expresión de CD48 en células diana inhibió, en lugar de potenciar, la función de las células NK de ratón [100, 101]. Sin embargo, otros dos laboratorios encontraron que la expresión de CD48 en las células diana aumentaba la citotoxicidad en células NK de ratón [99, 102]. Aunque aún no se ha determinado si 2B4 ejerce un papel activador o inhibitorio, lo cierto es que tiene un papel regulador en las funciones de las células NK.

Existen datos que sugieren que 2B4, al igual que otros receptores relacionados con SLAMF1, pueden inhibir las funciones celulares inmunológicas en ciertas condiciones. Se observó que la expresión de CD48 en células diana inhibía la función de eliminación de células NK humanas inmaduras normales o uterinas [103, 104]. Además, la expresión de CRACC en una línea células de fibroblastos portadores de moléculas MHC-II inhibía la activación de desencadenada por el antígeno en células T de ratón [105]. Todos estos datos sugieren que los receptores de la familia del SLAMF1 tienen efectos pleitrópicos sobre las células inmunitarias y que pueden actuar unas veces como activadoras y otras como inhibidoras.

2.3.1.2.- Experimentos de estimulación con anticuerpos.

El primer miembro de la familia del SLAM al que se le otorgó un papel en la regulación inmunológica fue 2B4 [106]. Utilizando un anticuerpo monoclonal directo frente a 2B4 de ratón fue posible estimular citotoxicidad y secreción de IFN γ en células NK estimuladas con linfoquina (*Lymphokine-activated Killer Cells*, LAK). Además, promovía la capacidad de algunas células T para mediar la eliminación de las células diana restringido al complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). Un efecto similar se observó

más tarde con anticuerpos directos frente a 2B4, NTB-A y CRACC en células NK [96-98]. Estos hallazgos sugieren, pues, que 2B4, NTB-A y CRACC son receptores activadores en células T y NK.

Se ha descrito también que la interacción de SLAMF1 mediada por anticuerpos potencia la proliferación de células B como respuesta a IL-4 y anti-CD40 [107]. Asimismo, otro grupo mostró que la estimulación de células T humanas previamente activadas, o clones de células T humanas con anticuerpos monoclonales frente a SLAMF1, inducía la producción de IFN γ , aunque no IL-4, incluso en ausencia de interacciones accesorias del receptor de células T (*T Cell Receptor*, TCR) [108]. Un anticuerpo similar desarrollado frente a SLAMF1 de ratón aumentó la producción de IFN γ en células T murinas estimuladas con anticuerpos monoclonales frente a CD3 [109]. A diferencia de células T humanas, la activación de células T murinas por anticuerpos anti-SLAMF1 no ocurrió en ausencia de la interacción del TCR. En otros estudios, la ligación de SLAMF1 mediada por anticuerpos produjo citotoxicidad de células T CD8⁺, secreción de IL-12 e IL-8 por DC o producción de IL-12 por M Φ [110-113]. En conjunto, todos estos datos sugieren que SLAMF1 es un regulador positivo de la activación de células T, B, DC y M Φ .

Cabe aclarar que los resultados obtenidos con anticuerpos deben de ser interpretados cautelosamente ya que los anticuerpos pueden actuar como agonistas o antagonistas, y en ocasiones, pueden desencadenar efectos no fisiológicos. Por ello es preciso comparar y complementar con otro tipo de estudios [114-117].

2.3.1.3.- Análisis genéticos de ligación.

Existen una serie de datos genéticos que consolidaron la idea de que los receptores de la familia del SLAM tienen un papel fundamental en la regulación inmunitaria. Así, se encontró que el *locus* Sle1b se corresponde con el *locus* de la familia del SLAM en el cromosoma 1 de ratón. Este *locus* que confiere una mayor susceptibilidad al Lupus Eritematoso Sistémico (LES) a cepas de ratón tales como NZM2410 y 129Sv, en comparación con ratones C57BL/6 [118]. Se analizaron polimorfismos en el gen que codifica Ly108 para correlacionarlo más robustamente con la susceptibilidad a la enfermedad, a pesar de que los genes que codifican para otros miembros de la familia SLAM, concretamente Ly-9, podrían también participar. Se

concluyó que estos polimorfismos regulan la susceptibilidad al LES mediante la alteración de las funciones de las células B y de células T [118, 119].

Del mismo modo, se observó que el *locus* NKT1, que influye en el número de células NK-T y sus funciones en ratones con diabetes autoinmune tipo I (*nonobese diabetes*, NOD), se corresponde con el *locus* de *Slamf1* [120]. En concreto, se identificaron los genes que codifican SLAMF1 y Ly108 como posibles genes de susceptibilidad. Se observó que el *locus* NKT1 en los ratones NOD resultó en la reducción de expresión de SLAMF1 en los timocitos doble-positivos, lo que posiblemente explica el reducido número de células NK-T en estos animales.

Por último, en humano, se ha descrito un polimorfismo en el gen que codifica a 2B4 que aumenta la susceptibilidad a la Artritis Reumatoide en una población japonesa [121]. Además, un polimorfismo en el gen que codifica Ly9 afectada a la susceptibilidad de LES familiar en Canadá y el Reino Unido [122]. También influyó en la representación de los subconjuntos de células T CD8+ y CD4+.

En conjunto, estas observaciones proporcionan una fuerte evidencia correlativa en la que, a través de variaciones de la secuencia que afectan la función o expresión de proteínas, los genes relacionados con SLAMF1 están implicados en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes en humano y ratón.

2.3.4.- Análisis de ratones genéticamente modificados.

La principal limitación en los estudios de estimulación con anticuerpos y sobreexpresión es que esas manipulaciones pueden conllevar a efectos no fisiológicos. De igual modo, los estudios de ligación genética sólo correlacionan la implicación de productos génicos con funciones. Por esta razón, los estudios en ratones genéticamente modificados son cruciales para determinar la actividad fisiológica de las moléculas, evitando la posibilidad de la redundancia funcional y compensación por otras moléculas.

A lo largo de este tiempo se han desarrollado ratones mutantes para muchos receptores de la familia del SLAM. Los ratones a los que se les bloqueó SLAMF1 mostraron un defecto en la secreción de IL-4 mediada por TCR [110, 123]. Los ratones deficientes en 2B4

presentaban células NK con un fenotipo complejo diferente al mostrado en los ensayos de estimulación con anticuerpos. Concretamente, estas células tenían aumentada, en lugar de disminuida, la citotoxicidad hacia las células diana que expresaban CD48. Sin embargo, en las células diana con el CD48 bloqueado, la citotoxicidad estaba aumentada. Mientras que los datos genéticos implicaban a 2B4 en la regulación de la citotoxicidad mediada por células NK, los datos con ratones *knockout*, muestran que la interacción 2B4-CD48 puede tener dos tipos de efectos. Al parecer, 2B4 es inhibidor cuando interacciona con el CD48 de las células diana, y activador cuando interacciona con el CD48 de otras células NK. Aunque no está claro el papel exacto de 2B4, la mayoría de los estudios coinciden en que este correceptor presenta un papel activador en células NK [100, 124, 125].

Las células NK procedentes de ratones deficientes en CRACC, presentaban disminuida la capacidad de eliminación y la producción de IFN γ en respuesta a células diana que expresan CRACC, sabiendo que este receptor tiene una interacción homotípica. Su capacidad para reaccionar frente a dianas CRACC $^{-}$ también estaba disminuida aunque no tan fuertemente como al reaccionar con dianas CRACC $^{+}$. Esto sugiere que la interacción CRACC-CRACC promueve la activación de células NK en un contexto de interacciones homotípicas o heterotípicas en la interacción NK-célula diana [105].

Además, existía un desarrollo reducido de células NK-T que era más severo al combinar la deficiencia de Ly108 con la deficiencia de SLAMF1, causado por un defecto en la interacción homotípica en los timocitos doble-positivos, los cuales son precursores de las células NK-T [126]. Los ratones con una mutación en el gen que codifica Ly9 mostraron un defecto en la proliferación inducida por TCR y en la secreción de IL-2 [127].

Este tipo de estudios hacen una baja estimación de la función individual de los receptores de la familia del SLAM puesto que los diferentes tipos celulares inmunológicos expresan varios miembros de esta familia simultáneamente. La creación de ratones deficientes para varios de estos receptores aclararía este aspecto pero resulta muy complicado por la yuxtaposición los genes relacionados con SLAM.

2.3.2- Función de SLAMF en células de origen mieloide megacariocito.

La expresión de moléculas de la familia de SLAM en células del linaje mieloide es bien conocida, aunque el estudio de la función de éstas en profundidad se viene desarrollando más recientemente. SLAMF1, CD48 (SLAMF2) y CD84 se encuentran en casi todas las células de origen hematopoyético, incluso SLAMF1 y CD84 participan en la agregación de plaquetas. Está descrito que en MΦ humano y de ratón expresan además Ly9, SLAMF8, SLAMF7 y SLAMF9 [3]. Estos tres últimos miembros se encuentran en Mo y DC humanas y de ratón. Curiosamente se ha descrito la expresión de 2B4 (SLAMF3) únicamente en eosinófilos, mastocitos y basófilos humanos, aunque no en ratón, y Ly108 en neutrófilos de ratón.

Uno de los miembros de la familia más destacado en estas células es SLAMF1, cuya función sería actuar en los como receptor de células GRAM negativa como el TLR-4 [110]. SLAMF1 está también implicado en la maduración del fagosoma y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) del complejo NADPH oxidasa, que guarda un paralelismo funcional con la función de Ly108 en neutrófilos [7]. Aparte, los MΦ de ratones deficientes en SLAMF1 tenían alterada la producción de IL-12, TNF- α , IL-6 y NO en respuesta a LPS [128]. Así, los ratones deficientes en SLAMF1 muestran más susceptibilidad a *Leishmania* asociado a esta reducida producción de IL-12 por parte del MΦ [110]. Estos resultados parecen estar en contradicción con el papel negativo de SLAMF1 en la producción de citoquinas mediada por CD40L en DCs humanas. Es posible que la regulación en la producción de citoquinas por SLAMF1 sea diferente entre MΦ y DC, o bien, que SLAMF1 tenga efectos opuestos dependiendo del estímulo [92]. Las DC, coestimuladas previamente con células portadoras de CD40L y SLAMF1, inhibieron la diferenciación de células T CD4⁺ *naïve* a efectoras tipo Th1. En ensayos de unión de SLAMF1 humano con anticuerpos en DC activadas por CD40L se aumentó la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como, IL-12 y IL-8, pero no de IL-10 [112]. Por otro lado, la estimulación de IL-10 en DC humanas genera DC tolerogénicas, un subconjunto de DC que induce la generación de células T reguladoras *in vitro* [129-130]. Puesto que el mecanismo subyacente a la inhibición mediada por IL-10 no puede provenir de una regulación directa de la secreción de citoquinas, y sí de una modulación de moléculas de la superficie, y dado que SLAMF1 se encuentra entre los receptores que están incrementados tras la activación por IL-10 de las DC, éste podría estar implicado en los mecanismos por los cuales estas DCs tolerogénicas median la inmunosupresión [131, 132].

Los neutrófilos de ratones Ly108^{-/-} producían 5 veces más IL-12, dos veces más TNF α y tenía ligeramente elevada la producción de IL-6 en comparación con los neutrófilos WT. Además, los ratones Ly108^{-/-} eran muy susceptibles a *Salmonella typhimurium* y mostrando un defecto en la eliminación de bacteriana dependiente de neutrófilos *in vitro*, defecto parece estar asociado a un defecto en la producción de ROS y no a la ineficiente incorporación de bacteria [133]. Recientes estudios sugieren que la interacción del CD84 debe influir en la producción de citoquinas en M Φ derivados de médula ósea activados con LPS [134].

En eosinófilos, se ha observado una mayor expresión de CD48 en pacientes asmáticos y en pulmones con alérgenos que sugiere un posible papel esta proteína en la patogénesis del asma. En un modelo de inflamación alérgica de las vías respiratorias se observó que el tratamiento con anticuerpos CD48, y no con CD244, redujo la inflamación eosinofílica y la expresión de citoquinas [135, 136]. El ensamblaje de CD48 en los eosinófilos también causó la liberación de peroxidasa de eosinófilos (EPO), un enzima que induce daño tisular.

En plaquetas, SLAM y CD84 han sido identificados como receptores que se ensamblan durante agregación plaquetaria. CD84 parece ser importante para la estimulación de plaquetas y SLAM contribuiría a la estabilización de los agregados plaquetarios *in vitro* y en la formación de trombos *in vivo*. Se ha observado que las plaquetas deficientes en SLAMF1 mostraban una agregación defectuosa como respuesta a la estimulación del receptor de colágeno o trombina [128].

Por otra parte, la expresión de CD84 en una línea de celular de basófilos de rata suprimía la degranulación mediada por IgE [137].

2.4.- SLAMF8.

SLAMF8 es uno de los miembros de la familia del SLAM descritos más recientemente. Es una glicoproteína presente en el cromosoma humano 1q23 y en el ratón en el locus 1H2, al igual que los otros miembros; es el primer miembro de la familia del SLAM localizado en la posición 5' en humano. En ratón se localiza en la posición 3', invertida a la distribución en humanos. SLAMF8 fue originariamente clonado de la librería humana MLR. Es una proteína transmembrana tipo I que consta de una región extracelular de 212 aminoácidos (aa). Al igual que el resto de los miembros de la familia, presenta, un dominio N-proximal tipo

inmunoglobulina IgV sin puente disulfuro y un dominio membrana-proximal tipo IgC2 (según el programa informático HMMER y modelos de la base de datos PFAM). La porción intermembrana es de 21 aa (estimado por MEMSAT) y la cola corta citoplasmática de 31 aa, región que no presenta motivos de señalización u otras secuencias para reconocimiento de proteínas de transmisión de señal. La secuencia de aminoácidos de ratón muestra una homología de un 75% con respecto a la secuencia humana, y tiene una alta homología en su región extracelular con CD48 y CD58 [5, 20]. El tipo de interacción de SLAMF8 aún está por determinar.

Ensayos de sobreexpresión de SLAMF8 humano, mediante retrovirus en células madre hematopoyéticas de ratón y transferidas a ratones irradiados, mostraron un incremento de células B1 en sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos y sobre todo en la cavidad peritoneal. Estas células presentaban un fenotipo CD5⁻, CD23^{low} y Mac1^{low}, característico de la subpoblación B1b. Esto sugirió en un principio que SLAMF8 podría tener algún papel en el linaje B y/o modulación de señales mediante el receptor de células B [20], sin embargo, los ratones deficientes en SLAMF8 (*SALMF8*^{-/-}) no mostraron diferencias en el número total, proporción o funcionalidad de estas células (Resultados de A.C. Abadía-Molina).

Mediante análisis por PCR cuantitativa (TaqMan) y *Northern Blot* se estudió en tejido linfoide y células sanguíneas de humano se observó una baja expresión en células CD4 (células T colaboradoras), CD8 (células T citotóxicas), CD19 (células B), granulocitos, HMDVC estimuladas con IL-1 β o TNF α (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*), células CD3 (células T) estimuladas con fitohemaglutinina (PHA). Sin embargo, se detectó una alta expresión del mensajero en células mononucleares de sangre periférica, células CD14 (monocitos), DC tipo I y una subpoblación de células B maduras [20, 138]. Por tanto, SLAMF8 podría estar implicado en la regulación de las funciones inmunológicas de estas células al igual de otros miembros de la familia como SLAMF1 o CD48 [5, 110, 139].

3.- NADPH oxidasa y producción de Especies Reactivas de Oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) son derivados del oxígeno que aparecen como consecuencia del metabolismo aerobio. En un principio, la

producción de ROS se describió como un mecanismo nocivo para la célula, aunque desde los años 80 se viene demostrando la importancia biológica de estos subproductos de vida media corta. En la actualidad sabemos que además de la cadena respiratoria mitocondrial, diferentes enzimas oxidativas análogos de la NADPH oxidasa y la Oxidasa dual (DUOX, *dual oxidase*) producen superóxido ($O_2^{\bullet-}$), primer radical en la reacción oxidativa, de forma regular en distintas células y tejidos. Esto es indicativo de su importancia en determinadas funciones biológicas. Por otro lado, las células cuentan con sustancias antioxidantes que mantienen la homeostasis y controlan el exceso de producción de radicales libres. A pequeñas concentraciones, los ROS actúan como segundos mensajeros. Esta función no se realiza directamente por el ion superóxido sino por sus derivados. En exceso, los ROS pueden ser bastante dañinos, afectando a proteínas, lípidos y DNA. Un desequilibrio elevado o constante de ROS está asociado a patologías como cáncer, diabetes, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, etc.

3.1- Tipos de enzimas NOX.

La producción de superóxido ocurre por vía no enzimática, principalmente mediante la cadena de electrones mitocondrial, o bien, por vía enzimática. Las enzimas nicotidamina adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa utilizan NADPH y oxígeno para formar $NADPH^+$ y $O_2^{\bullet-}$. En fagocitos y otros tipos celulares, estas enzimas inducen la formación de $O_2^{\bullet-}$ en respuesta a microorganismos y diferentes estímulos, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, etc.

Las enzimas NADPH oxidasa se clasifican principalmente en tres grupos en función de la presencia de dominios adicionales al dominio de gp91phox (Tabla 4). Existe un primer grupo formado por NOX1, NOX3 y NOX4, las cuales poseen un tamaño y estructura muy similar a gp91phox (NOX2). Estos contienen centros de transferencia de electrones requeridos para el intercambio de electrones desde la molécula de NADPH al oxígeno para formar $O_2^{\bullet-}$ [140]. Otras flavoproteínas similares a la subunidad gp91phox son responsables de la producción de ROS. NOX5 se distingue por tener la estructura base de gp91phox más un dominio amino terminal tipo calmodulina que contiene cuatro sitios de unión al calcio [140]. El tercer grupo está constituido por las enzimas DUOX (DUOX1 y DUOX2) que comparte la estructura de NOX5 más un dominio de homología a la peroxidasa [141]. Las enzimas NADPH oxidasa se expresan en diferentes células o tejidos y están reguladas por distintos factores (Tabla 4).

Tabla 4 | Enzimas NOX/DUOX humanas [4].

Enzima	Niveles altos de expresión	Factores reguladores conocidos
gp91phox (NOX2)	Fagocitos	p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} y RAC1/RAC2
NOX1	Inducible en colon y músculo liso vascular	NOXO1, NOXA1 y p22phox
NOX3	Riñón fetal	N.D.
NOX4	Riñón, osteoclastos, ovario y ojo; generalizado	N.D.
NOX5	Bazo, espermatozoides, glándulas mamarias y cerebro	Calcio
DUOX1	Tiroides, cerebelo y pulmón	Calcio
DUOX2	Tiroides, colon, isletas pancreáticas y próstata	Calcio

DUOX, oxidasa dual; N.D., no determinado; NOX, oxidasa NADPH; NOXA1, activador 1 NOX; NOXO1, organizador 1 NOX 1.

La producción de ROS ocurre cuando el grupo NADPH, situado en la cara citosólica de la membrana, se oxida y realiza un transporte de electrones a lo largo de la membrana que escapan y reducen el oxígeno para generar superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Después, dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ pueden reaccionar para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una reacción conocida como dismutación, que está acelerada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). En presencia de hierro, el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 reaccionan para generar hidroxilo (OH^{\bullet}). Además de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^{\bullet} , en los sistemas biológicos se producen otros ROS, o NO y peroxinitritos. Por ejemplo, en las áreas inflamadas los neutrófilos generan ácido hipocloroso (HOCl) a partir H_2O_2 y cloruro por la enzima mieloperoxidasa de fagocitos (MPO). En las zonas de inflamación se puede formar además oxígeno singlete, formado a partir de oxígeno e iones haluro a través de la oxidación catalizada de NADPH oxidasa de fagocitos y MPO, o bien, formarse ozono generado a partir de oxígeno singlete por moléculas de anticuerpos. De esta manera los microorganismos a los que se le unieron los anticuerpos son expuestos a los ROS producidos por los fagocitos en las áreas inflamadas [4].

3.2- NADPH oxidasa de fagocitos.

Los monocitos y MΦ, junto con los neutrófilos y eosinófilos, constituyen la principal barrera de defensa frente a bacterias, hongos y parásitos [142, 143]. Una de las respuestas críticas de los fagocitos a los agentes estimulantes es la producción ROS, crítico para la eliminación de los patógenos así como para el mantenimiento de la respuesta inmunológica del hospedador [18]. Los neutrófilos y MΦ inician la producción ROS mediante la activación de la NADPH oxidasa al contacto con el microorganismo, que produce anión $O_2^{\bullet-}$, y que da origen al resto de las especies reactivas de oxígeno.

Todas estas moléculas son producidas por los fagocitos en una "explosión oxidativa", que se caracteriza por un rápido aumento en la captación de oxígeno no sensible al cianuro, un aumento en el consumo de glucosa y la liberación de ROS. La enzima responsable de la producción de $O_2^{\bullet-}$ es la NADPH oxidasa de fagocitos [144, 145]. La importancia de este enzima se refleja en una patología congénita llamada enfermedad granulomatosa crónica, que es una alteración genética caracterizada por la ausencia de producción de ROS debido a la deficiencia de uno de los componentes de la NADPH oxidasa. Las células fagocíticas, entonces, son incapaces de eliminar a las bacterias y hongos, causando infecciones prolongadas y/o recurrentes [146, 147].

La NADPH oxidasa del fagocito consta de varias subunidades de membrana y otras subunidades localizadas en el citosol [144, 145, 148]. Las proteínas citosólicas son $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$ (phox: oxidasa de los fagocitos), que interactúan unas con otras para formar un complejo, y una G-proteína, Rac1 (principalmente en Mo humanos) o Rac2 (en neutrófilos humanos) [149]. Los componentes asociados a la membrana de la NADPH oxidasa son $gp91^{phox}$ (conocida también como NOX2) que es una proteína glicosilada 91 kDa, y $p22^{phox}$, de 22 kDa. Ambos se asocian formando el flavocitocromo b_{558} [150].

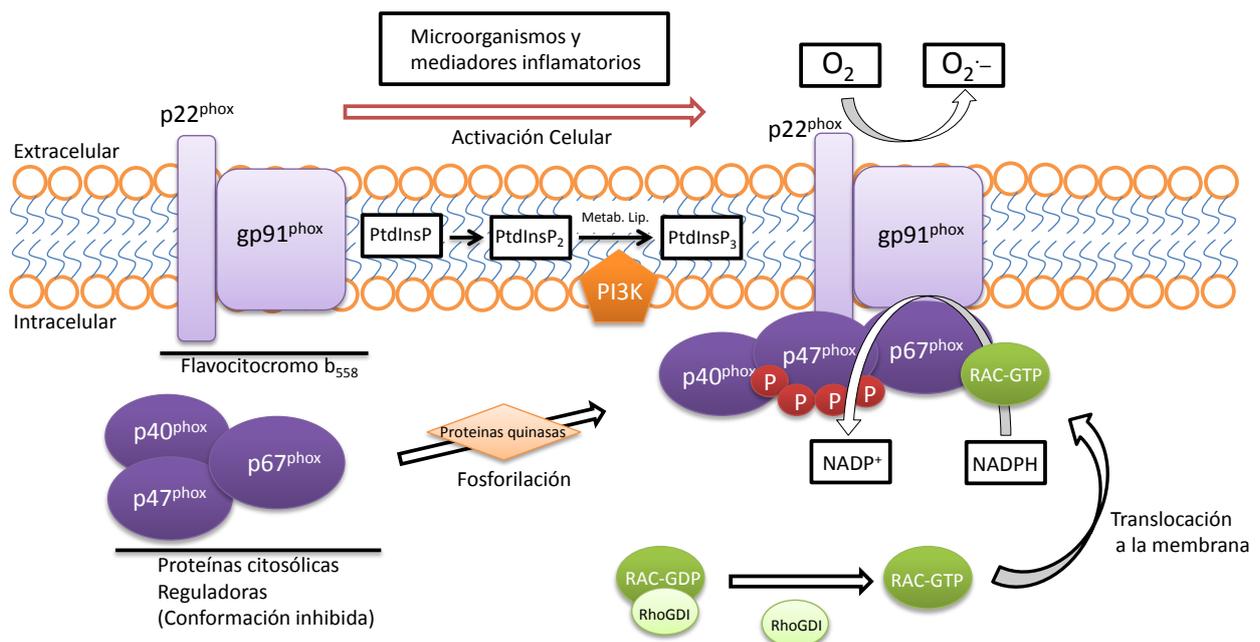


Figura 4 | **Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el ensamblaje de NOX2** [4]. La activación del sistema gp91^{phox} tiene como resultado el ensamblaje de las proteínas reguladoras citosólicas (p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}) con el flavocitocromo b₅₅₈ (que consta de la subunidad catalítica gp91^{phox} asociada a la membrana más p22^{phox}). Este proceso involucra proteínas quinazas, enzimas que metabolizan los lípidos y proteínas de intercambio de nucleótidos que activan el RAC GTPasa. Las proteínas quinazas, incluyendo la proteína quinasa C y AKT, catalizan muchas fosforilaciones de la región de autoinhibición (AIR) de p47^{phox}, liberando su unión al dominio de homología 3 bis-SRC (SH3) y permitiendo que p47^{phox} se una a p22^{phox}. Esto también evita la inhibición del dominio de homología phox (PX) de p47^{phox}, permitiendo la unión a lípidos. La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa D producen fosfatidilinositol-3 fosforilado (PtdInsP) y ácido fosfatídico, respectivamente, proporcionando los lípidos a los cuales se unen los dominios PX de p47^{phox} y p40^{phox}. RAC-GDP, está bloqueado por la proteína inhibidora RhoGDI (*RhoGDP-dissociation inhibitor*), manteniendo a RAC en el citosol. Tras la activación, se produce la unión del GTP, dando lugar a cambios conformacionales en RAC que promueven la disociación de RhoGDI y la asociación a la membrana a través del lípido geranilo-geranilo, modificación post-traduccional de RAC. El cambio conformacional también promueve la unión de RAC a la región tricodcapeptida (TPR) de p67^{phox}, ayudando a ensamblar el complejo activo.

La subunidad gp91^{phox} contiene sitios de unión para el FAD (flavín adenín dinucleótido) y NADPH, y dos grupos hemo, funcionando como la cadena transportadora de electrones de la NADPH oxidasa activa. La separación espacial de los componentes de la NADPH oxidasa asegura que la enzima esté latente en las células en reposo. Cuando las células son

estimuladas, los componentes citosólicos migran casi instantáneamente a la membrana donde se unen con el flavocitocromo b_{558} para formar la enzima activa. Este proceso está finamente regulado por las interacciones proteína-proteína y por la fosforilación de las subunidades que constituyen este enzima [149, 151-153].

3.3- Activación y regulación de la NADPH oxidasa.

3.3.1- Activación y ensamblaje de la NADPH oxidasa.

La regulación de gp91phox (NOX2) tiene lugar a través de subunidades reguladoras que incluye la subunidad de membrana $p22^{phox}$ y las subunidades citoplasmáticas $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ y la GTPasa RAC (RAC1 o RAC2) [154]. La subunidad $p22^{phox}$ contiene una secuencia carboxiterminal rica en prolina que sirve como diana a los dos dominios de homología a SRC (*SRC-homology 3 domains*, bis-SH3) de $p47^{phox}$ [155, 156]. El flavocitocromo b_{558} es inactivo en fagocitos en estado de reposo, de modo que cuando la célula es expuesta a microorganismos o mediadores inflamatorios, las subunidades citosólicas se ensamblan y se trasladan a la membrana para unirse al flavocitocromo b_{558} . En condiciones de reposo la subunidad citoplasmática $p47^{phox}$ se encuentra plegada y la región autoinhibidora AIR (*Authohibitory región*) se combina con el dominio bis-SH3 central, impidiendo así que éste se una a $p22^{phox}$ [155] (Figura 4). La región AIR queda inactivada una vez fosforilada, dejando accesible el dominio de interacción a $p22^{phox}$. Por otra parte, el dominio SH3 carboxiterminal de $p47^{phox}$ también interacciona con el dominio PX de homología Phox (*Phox-homology (PX) domain*) a través de una secuencia rica en prolina del dominio PX [157]. Esta interacción inhibe la unión del dominio PX con los lípidos de la membrana [155]. La subunidad $p47^{phox}$ forma un complejo en el citosol con $p67^{phox}$ y $p40^{phox}$, por otro lado, RAC está ligado a la proteína inhibidora Rho-GDPI (*Rho-GDP-dissociation inhibitor*). La activación celular inicia al menos tres mecanismos moleculares, fosforilación de proteínas, metabolismo lipídico e intercambio en RAC de GTP por GDP, que dan como resultado la translocación a la membrana, y ensamblaje con el flavocitocromo, de los componentes citosólicos. El $p47^{phox}$ interacciona también a $p67^{phox}$, por lo que se considera la molécula organizadora del complejo. El dominio de activación de la subunidad $p67^{phox}$ contacta con el flavocitocromo y activa a su vez la

transferencia de electrones desde la molécula de NADPH hasta el FAD unido y ello culmina en la producción de superóxido [158, 159].

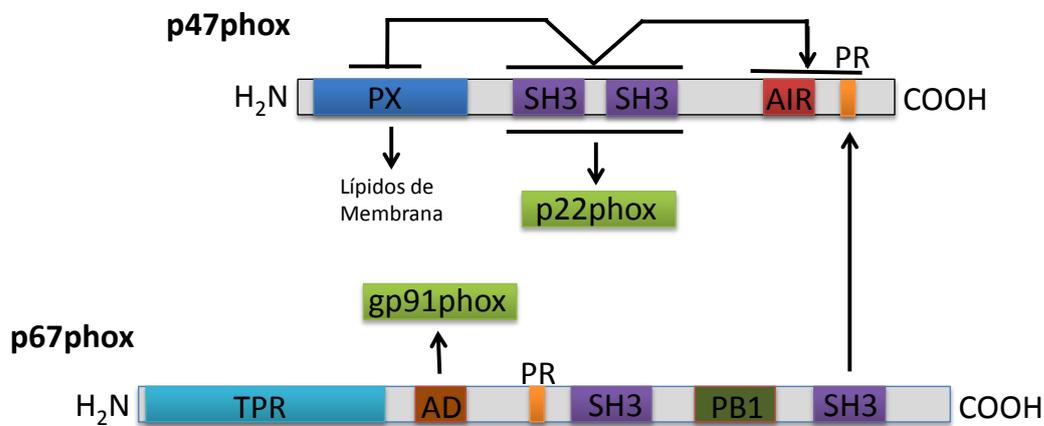


Figura 5 | **Regiones reguladoras en la NADPH oxidasa (NOX2)** [4]. En este esquema se muestran las regiones reguladoras de las subunidades que conforman el complejo NADPH oxidasa. La subunidad reguladora p47^{phox} tiene una región de autoinhibición (AIR). El dominio SRC de homología 3 (SH3) de p67^{phox} se une generalmente a secuencias ricas en prolina (PR). En el caso de p47^{phox}, los dominios adyacentes SH3 trabajan como un solo dominio; en este esquema se representa como un dominio bis-SH3. En la subunidad p67^{phox}, existen cuatro dominios de repetición tricodcapeptido (TPR) por donde interacciona con RAC contribuyendo así al ensamblaje completo del complejo. El dominio de homología phox (PX) se encuentra en muchas proteínas de señalización y normalmente está implicado en la unión de lípidos. El dominio PB1, llamado así por su presencia en phox y proteínas Bem1p, se localiza en diversas proteínas de señalización citoplasmáticas de eucariotas y suele estar implicado en las interacciones proteína-proteína. Las

3.3.2.- Rutas de señalización para la activación de la NADPH Oxidasa en fagocitos.

La estimulación de los fagocitos mediada por diferentes estímulos conlleva el ensamblaje de los componentes fosforilados del complejo NADPH oxidasa, activación de esta enzima y posterior producción de ROS. En los últimos años han sido numerosos los estudios realizados en los que se pretende comprender a través de qué vías se produce dicha activación. En la activación de la NADPH oxidasa se ha podido constatar la participación de

quinasas entre las que destacan por su importancia la familia de proteína quinasa C (PKC), distintas proteínas de la familia de las MAP quinasas (MAPK) y la PI3K, ampliamente estudiadas en fagocitos [15-19].

3.3.2.1.- Activación de NADPH oxidasa por la familia de proteína quinasa C

La proteína quinasa C (PKC) es una familia de enzimas que se activan fisiológicamente por el 1,2-diacilglicerol [160] y otros lípidos [161]. Estudios en fagocitos humanos y de ratón indican que la PKC es esencial para la activación de la NADPH oxidasa. Esta enzima es una quinasa que fosforila los residuos serina/threonina de sus substratos entre los que se incluyen ciertas subunidades de la NADPH oxidasa. Su acción precede al proceso de ensamblaje del complejo, actuando como primer punto de control para la activación de la NADPH oxidasa, siendo las subunidades citosólicas $p67^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$ y $p40^{\text{phox}}$ y los componentes del flavocitocromo b_{558} , que presentan motivos de fosforilación para PKC. La proteína PKC presenta 12 isoformas, con localización y actuación en diferentes rutas. Las PKC más relevantes en la activación de NADPH oxidasa son las PKC α , PKC β y PKC δ , perteneciente a las PKC clásicas [15, 19, 94, 151, 162-167].

La subunidad $p47^{\text{phox}}$ ha sido el componente más estudiado del complejo NADPH oxidasa. *In vitro*, la subunidad $p47^{\text{phox}}$ es fosforilada por diferentes enzimas, como PKC α , β , γ y δ [165, 168, 169], PKA [169, 170], ERK2 and p38 MAPK [171], quinasa p21- activada (PAK) [172], entre otras. *In vivo*, se ha confirmado esta fosforilación por un amplio grupo de proteínas quinasas asociadas a la fosforilación de $p47^{\text{phox}}$ y por tanto con la regulación de la NADPH oxidasa de células activadas con fMLF (*N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*) o PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) como es el caso de PKC ζ [165, 173], PKC β [173, 174], PKC δ [175-177], PAK [172], ERK1/2 [178] y AKT [19]. En neutrófilos, mientras que la fosforilación de $p47^{\text{phox}}$ por PKC, PAK y AKT tiene un efecto estimulador en la activación de la NADPH oxidasa, la pre-fosforilación por p38 MAPK y ERK1/2 da como resultado la mejora de este efecto [2, 179].

Se ha descrito que la PKC juega un papel crucial en Mo y M Φ en la activación de la NADPH oxidasa [175, 180-182]. La activación del M Φ normalmente se desencadena por la

interacción de un receptor de la superficie celular con su ligando específico. Esto provoca la rápida hidrólisis de fosfolípidos de inositol a diacilglicerol y fosfatos de inositol por la fosfolipasa C (PLC), que tiene como resultado la liberación de Ca^{2+} . El diacilglicerol es un activador alostérico en la activación de la proteína quinasa C (PKC) y fosfatos de inositol desencadenan la liberación de Ca^{2+} y su movilización desde el retículo endoplasmático así como la activación de canales y bombas de la membrana plasmática, lo que resulta en una cascada de respuestas celulares adicionales que median la activación del MΦ [183]. El PMA, con una estructura análoga al diacilglicerol, que puede activar la PKC directamente [161].

3.3.2.2.- Activación de NADPH oxidasa por la ruta Vía de la MAP quinasa p38.

p38 MAPK es una quinasa serina/treonina que pertenece a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que se activan por la fosforilación de los residuos de tirosina y treonina. En neutrófilos, se ha descrito que p38 MAPK se activa en respuesta a una variedad de estímulos, tales como fMLP, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y MΦ (GM-CSF), lipopolisacárido o endotoxina (LPS) y zymosan, etc. La inhibición farmacológica de la p38 MAPK atenúa las diversas funciones de los neutrófilos, tales como la quimiotaxis, la adhesión, y la degranulación [184].

En monocitos y MΦ, las ROS generadas por el complejo NADPH oxidasa inducidas por M-CSF contribuyen a la supervivencia del Mo y Mg a través de la regulación de este la NADPH oxidasa vía p38 MAPK y Akt [185-188]. Además, p38 MAPK, junto con la vía PI3K y Src quinasa [189], desempeña un papel importante en estimulaciones con el LPS [188-190]. El LPS es reconocido por los Mo y los MΦ del sistema inmune innato, respondiendo mediante la expresión de diversas citoquinas inflamatorias. El LPS se une a la proteína de unión a LPS (LBP) en el plasma y es transportado al receptor de superficie celular CD14. Después, se transfiere al receptor transmembrana de señalización tipo Toll 4 (*toll-like receptor 4*, TLR4) y su proteína accesoria MD2. Esta estimulación de los monocitos humanos activa varias vías de señalización intracelulares que incluyen la vía quinasa I κ B (IKK)-NF- κ B y tres vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK): quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK), c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y p38, que coordinan la inducción de muchos genes que codifican mediadores de la inflamación [188]. Varios estudios muestran que los inhibidores de p38

MAPK bloquean parcialmente la activación de la NADPH oxidasa [184]. Por ejemplo, la inhibición de las rutas de ERK y p38 MAPK conlleva la pérdida de fosforilación de ciertas componentes de la NADPH oxidasa [191, 192]. El uso de inhibidores en neutrófilos bovinos ha podido demostrar que la p38 MAPK desempeña un papel en la activación de la NADPH oxidasa y la translocación de los componentes oxidasa citosólica, especialmente RAC, a la membrana plasmática mediante la regulación de la activación de RAC aguas abajo de PI3K [184].

3.3.2.3.- Implicación de RAC GTPasa en la activación de NADPH oxidasa.

Las proteínas RAC son un subconjunto de la subfamilia Rho de las GTPasas relacionadas con Ras GTPasas por presentar una 30 % de identidad con éstas. Las Rho GTPasas se denominan así por presentar un motivo característico, Rho, que las distingue del resto de las GTPasa. Esta subfamilia a su vez pertenece a la gran familia de las Ras-GTPasas y están compuestas por proteínas monoméricas con un tamaño aproximado de 22 kDa, representadas en la especie humana por al menos 23 miembros, de las cuales RAC, Cdc42 y Rho son las que mejor han sido caracterizadas. Dentro de la familia RAC1 RAC2 y RAC3 comparten hasta un 88 % de identidad en su secuencia peptídica. Mientras RAC1 parece tener una expresión ubicua en las células, RAC2 está restringida a células de origen hematopoyético y RAC3 tiene restringida su expresión en el cerebro. Debe ser por esta razón que en humanos y ratones deficientes en RAC2 presentan defectos en la funcionalidad de las células hematopoyéticas [193, 194]. Esto además sugiere que estas enzimas RAC presenten algunas funciones no redundantes, debido a diferencias en su localización celular y proporción en que aparecen en los distintos leucocitos [194].

La primera función biológica atribuida a las Rac GTPasas fue la activación de la NADPH oxidasa de neutrófilos; se encontró que la adición de RAC1-GTP o RAC2-GTP era esencial para la producción de altos niveles de superóxido en ensayos de NADPH [195]. Además, RAC interactúa con diferentes proteínas efectoras para provocar respuestas celulares, tales como la reorganización del citoesqueleto y la activación de genes.

RAC GTPasas es un componente citosólico de la NADPH oxidasa, con un papel regulador principal en la activación de este enzima, activando la producción de ROS que a su

vez activan a la ruta de la p38 MAPK [196]. En neutrófilos, se ha descrito que la forma unida a GTP de RAC se ensambla a p67^{phox} y probablemente al flavocitocromo b₅₅₈ constituyendo el complejo oxidasa activo. En sistemas libres de células, la generación de O₂^{•-} aumenta sustancialmente mediante la adición de RAC. En estudios donde se utilizan transgenes de RAC u oligonucleótidos antisentido para manipular los niveles de RAC, han sugerido esta molécula regula la actividad de la NADPH oxidasa en células intactas. Recientemente se ha publicado que en la inmunodeficiencia de neutrófilos humana asociada con la mutación RAC2 y en ratones deficientes en RAC2, la actividad de la NADPH oxidasa está disminuida. Sin embargo, las señales de aguas arriba y las proteínas reguladoras que controlan la activación de RAC en los neutrófilos siguen siendo desconocidas. Hasta el momento, sólo se ha demostrado claramente la participación de las tirosina quinasas y la quinasa PI3K en la activación de RAC2 de neutrófilos estimulados fMLP [184].

En diferentes sistemas celulares y en respuesta a distintos estímulos se ha descrito la interacción que se produce entre la ruta RAC-GTPasas y la vía p38 MAPK, de manera que RAC es capaz de activar a p38 MAPK a través de diferentes vías. Por ejemplo, se ha comprobado que la angiotensina II produce hipertrofia a través de la activación de JNK y p38 MAPK [197], y que Ki-Ras desencadena la activación de RAC, que a su vez estimula la vía de señalización de p38 MAPK [198].

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que SLAMF8 se expresa de forma significativa en monocitos y macrófagos activados, que previamente se ha descrito la participación de SLAMF1 y CD48 en funciones microbicidas y en la modulación de la actividad NADPH oxidasa por SLAMF1, nos planteamos estudiar la función de SLAMF8 en macrófagos de ratón. Para llevar a cabo este estudio nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1.- Estudiar la activación de la NADPH oxidasa de fagocitos en macrófagos de ratón *SLAMF8*^{-/-} en comparación con macrófagos de ratón salvajes mediante detección del anión superóxido en células estimuladas con PMA, bacteria GRAM negativa *Escherichia coli*, y bacteria GRAM positiva *Staphylococcus aureus*.

2.- Analizar la activación, frente a diferentes estímulos, de las quinasas PKC y p38 MAPK en macrófagos de ratón *SLAMF8*^{-/-} y salvajes mediante el estudio de la fosforilación de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox}, y de la fosforilación de p38 MAPK.

3.- Comparar el reclutamiento y ensamblaje de las subunidades p22^{phox} y p47^{phox} en membrana de los fagocitos en macrófagos de ratón *SLAMF8*^{-/-} y salvajes mediante microscopia confocal de fluorescencia.

4.- Analizar la movilización de las proteínas RAC GTPasa hacia la membrana en macrófagos de ratón *SLAMF8*^{-/-} y en comparación con macrófagos salvajes frente a diferentes estímulos.

5.- Examinar la activación de la subunidad p47^{phox} en monocitos humanos en reposo y estimulados con IFN γ con objeto de determinar si el incremento de SLAMF8 en estas células induce cambios en la activación de esta subunidad.

6.- Estudiar la capacidad microbicida *in vivo* de los ratones *SLAMF8*^{-/-} en un modelo de sepsis mediante inyección de la bacteria *Salmonella typhimurium*.

AIMS

Considering that SLAMF8 is significantly expressed in activated monocytes and macrophages, that SLAMF1 and CD48 are involved in microbicide functions of macrophages, and recently was described that SLAMF1 modulates the activation of NADPH oxidase of phagocytes, we aimed to analyze the function of SLAMF8 in mouse macrophages. For that we consider the following specific aims:

1.- Analysis of the activation of phagocyte NADPH oxidase in mouse *SLAMF8*^{-/-} macrophages compared with mouse wild type macrophages, for that superoxide anion detection was performed on stimulated cells with PMA, the GRAM-negative bacteria *Escherichia coli* and the GRAM-positive bacteria *Staphylococcus aureus*.

2.- Analyze PKC and p38 MAPK kinases activation with different stimuli in *SLAMF8*^{-/-} mouse macrophages and wild type macrophages by studying phosphorylation of p47^{phox} and p40^{phox} subunits and phosphorylation of p38 MAPK.

3.- Analysis of the recruitment and assembly of p47^{phox} and p22^{phox} subunits to phagocyte membrane in *SLAMF8*^{-/-} and wild type macrophages by confocal fluorescent microscopy.

4.- Aanalysis of RAC GTPasas mobilization to membrane in mouse *SLAMF8*^{-/-} macrophages compared to wild type macrophages using various stimuli.

5.- Examination of p47^{phox} subunit activation in resting and IFN γ stimulated human monocytes to determine whether SLAMF8 increment induces changes in the activation of this subunit in these type of cells.

6.- Analisis of the *in vivo* microbicidal capability of *SLAMF8*^{-/-} mice using the mouse model of sepsis with injection of *Salmonella typhimurium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Ratones.

Los protocolos realizados en este trabajo han sido aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Granada. Referencias: CEEA-379 y CEEA-417-2012.

Todos los ratones utilizados en este trabajo tenían entre 8 y 12 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados en atmosfera saturada de CO₂. Los ratones salvajes (*wild type*, WT) utilizados como control en los ensayos fueron ratones BALB/cAnNHsd consanguíneos, suministrados por los laboratorios Harlan®. Los ratones BALB/c deficientes en Slamf8 ($\text{Slamf8}^{\Delta\text{E2-4}}$ o $\text{SLAMF8}^{-/-}$) fueron desarrollados por el Dr. A. Coyle y el Dr. J. C. Gutiérrez-Ramos (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA) y donados gentilmente por el Dr. Terhorst al laboratorio de la Dra. Ana C. Abadía Molina. Los ratones $\text{Slamf8}^{\Delta\text{E2-4}}$ fueron desarrollados como se indica a continuación.

2.- Ratones deficientes en SLAMF8.

Los ratones BALB/c deficientes en Slamf8 ($\text{Slamf8}^{\Delta\text{E2-4}}$ o $\text{SLAMF8}^{-/-}$) fueron desarrollados por el Dr. A. Coyle y el Dr. J. C. Gutiérrez-Ramos (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA). El vector fue generado a partir de un clon pBAC 129/Sv de ratón (RPCI-22), clonado en el vector neo/tk/pBluescript. Las regiones extracitoplasmática y transmembrana, correspondientes a los exones 2-4 del gen, fueron reemplazadas por el gen de resistencia a neomicina MC1neo. El vector linearizado se insertó en células madre embrionales (ES) BALB/cJ (clon parental MKV39.7). Las células ES resistentes a G418 (neomicina) fueron seleccionadas por *Southern blot*, se inyectaron en blastocitos BALB/c y los ratones con transmisión a línea germinal se cruzaron con ratones BALB/c hasta obtener la generación homocigótica. Por tanto, el haplotipo del ratón es BALB/c puro. Estos ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos (*specific pathogens free*, SPF) en el animalario del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

3.- Genotipado de ratones *SLAMF8*^{-/-} por PCR genómica.

El genotipado de los ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} se realizó mediante PCR genómica a partir de un fragmento de 1 cm aproximadamente de la cola del ratón. El tejido fue digerido durante 16 h. a 55 °C en 500 µl de una solución tamponada con 1 mg/ml de Proteinasa K (50 mM TRIS-Cl pH 8 (SIGMA-ALDRICH), 0.1 M EDTA (Merck), 0.5 % SDS [199]). Al día siguiente, se añadió 50 µl de acetato sódico (3 M, pH 7) y 500 µl de fenol-cloroformo (Invitrogen) (1:1). Se mezcló por Vortex y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min. Al sobrenadante obtenido se le añadió 350 µl de isopropanol (SIGMA-ALDRICH) y se volvió a centrifugar durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y al botón de precipitado se le añadió 1 ml de etanol 70 %, y se centrifugó durante 1 min. Al botón de precipitado formado se le agregó 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó de nuevo. Cuidadosamente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de precipitado al aire. El DNA precipitado se suspendió en 100 µl de agua doble destilada durante 16 h. a 55 °C.

Con el ADN genómico aislado se realizó una PCR convencional con 500 ng DNA. Se utilizaron tres cebadores, donde P1 y P2 amplifican el alelo endógeno *Slamf8* WT (del exón1 al 2), dando una banda de 420 pb que se detectó en ratones WT y heterocigotos, mientras que P1 y P3 amplificaron el gen de la neomicina produciendo una banda de 850 pb (tabla 1). Las condiciones de dicha amplificación fueron: 95 °C, 2 min. seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 2 min., 50 °C por 1 min. y 30 s., y 72 °C por 3 min. El producto PCR fue teñido con 1 mg/ml de bromuro de etidio (SIGMA-ALDRICH) y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Lonza) a 100 V durante 25 min. (PowerPac Basic™, BioRad). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar de 100 pb para el seguimiento del producto amplificado (Bench Top 100 pb DNA ladder, Promega).

Tabla 1 | Cebadores usados en la PCR de DNA genómico de ratones *SLAMF8*^{-/-}.

Nombre	Descripción	Región
P1	<i>Slamf8</i> DNA Exon 1, <i>Forward</i>	5'- GAAAGGAGGCTGACTTACAAGAAC -3'
P2	<i>Slamf8</i> DNA Exon 2, <i>Reverse</i>	5'- CTGGATACAGATGCCACTGGTAAC -3'
P3	<i>Slamf8</i> DNA <i>Cassette</i> NEO, <i>Forward</i>	5'- AGGTAGCCGGATCAAGCGTAT -3'

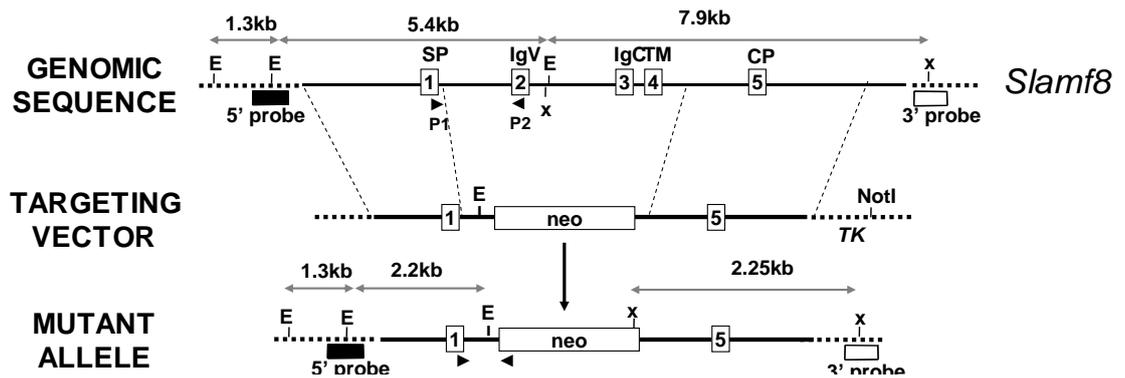


Figura 1 | **Sustitución de Slamf8 en ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} (*Slamf8*^{ΔE2-4}) [1].** Para la elaboración de los ratones *knockout*, se eliminaron las regiones extracitoplasmática y transmembrana correspondientes a los exones 2-4 del gen, y se reemplazaron por el gen de resistencia a neomicina MC1neo. Este esquema muestra la posición de los cebadores usados en la PCR de genómico a partir de la cola de ratón para la confirmación de los ratones *SLAMF8*^{-/-}.

4.- Extracción de RNA y RT-PCR.

El RNA total se obtuvo a partir de $1 \cdot 10^6$ MΦ peritoneales o Mo humanos aislados de sangre periférica, ambos tipos celulares preincubados o no con IFN γ , usando el método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent InvitrogenTM, Life Technologies) de Chomczynski [200]. A continuación, se hizo una retrotranscripción a partir de 1 μ g de RNA total con un kit comercial (*Reverse transcription System*, Promega). Más tarde, se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del DNA complementario (cDNA) obtenido amplificando los genes predeterminados con sus respectivos controles endógenos, usando las secuencias de cebadores correspondientes (tablas 2-4), con las siguientes condiciones: 95 °C, 2 min. seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C durante 2 min., 45-50 °C por 1 min. y 30 s., y 72 °C por 3 min. El producto PCR fue teñido con 1 mg/ml de bromuro de etidio (SIGMA-ALDRICH) y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Lonza) a 100 V durante 25 min. (PowerPac BasicTM, BioRad). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar de 100 pb para el seguimiento del producto amplificado (Bench Top 100 pb DNA ladder, Promega).

Tabla 2 | Cebadores usados en la RT-PCR de los exones de Slamf8 en ratones BALB/c WT y *SLAMF8*^{-/-}.

Nombre	Descripción	Región
P1	Slamf8 RNA Exon 1, <i>Forward</i>	5'-atgtggccctctggagtcttcttc-3'
P2	Slamf8 RNA Exon 2, <i>Forward</i>	5'-ctctccttcccgttggtgtca-3'
P3	Slamf8 RNA Exon 3, <i>Forward</i>	5'-atgcagtaccaagcccagggttc-3'
P4	Slamf8 RNA Exon 3, <i>Reverse</i>	5'-ctgcctcgtgatggcagctctcc-3'
P5	Slamf8 RNA Exon 4, <i>Reverse</i>	5'-ctgagcagaggccatggtgcat-3'
P6	Slamf8 RNA Exon 5, <i>Reverse</i>	5'-ctatacagggcattctctgtctctgg-3'

Tabla 3 | Cebadores usados en la RT-PCR de macrófagos de ratón *SLAMF8*^{-/-} y WT pretratados o no con IFN γ durante 24 horas.

Nombre	Descripción	Región
mBL-F (P1)	Slamf8 de ratón, <i>Forward</i>	5'- atgtggccctctggagtcttcttc-3'
mBL-R (P6)	Slamf8 de ratón, <i>Reverse</i>	5'- ctatacagggcattctctgtctctgg-3'
mAct-F	β -Actina de ratón, <i>Forward</i>	5'- tgttaccaactgggacgaca -3'
mAct-R	β -Actina de ratón, <i>Reverse</i>	5'- ggggtgttgaaggctcaaa-3'

Tabla 4 | Cebadores usados en la RT-PCR de macrófagos humanos de sangre periférica tratados o no con IFN γ durante 24 horas.

Nombre	Descripción	Región
hBL-F	Slamf8 humano, <i>Forward</i>	5'- tcattaaggatgggaactttattag -3'
hBL-R	Slamf8 humano, <i>Reverse</i>	5'- caaagcagctctggatgaga -3'
β 2M-F	β -2-microglobulina humana, <i>Forward</i>	5'- ctcgctactctctcttctgg -3'
β 2M-R	β -2-microglobulina humana, <i>Reverse</i>	5'- tctacatgctcgatcccacttaa -3'

5.- Aislamiento de macrófagos peritoneales.

En estos ensayos se usaron MΦ frescos procedentes de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y ratones WT a los que se le inyectó en el peritoneo 2 ml de TGC 4 % (TGC, SIGMA-ALDRICH) solubilizado en agua destilada y autoclavado a 121 °C durante 15 min. Al 4º día posterior a la inyección del TGC se extrajeron las células peritoneales mediante lavado de la cavidad peritoneal con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco).

6.- Obtención de macrófagos de ratón derivados de médula ósea.

Para la obtención de médula ósea, se tomaron las patas traseras del ratón. Con un bisturí, se aisló el fémur y la tibia, eliminando el tejido muscular. Los huesos fueron desinfectados suspendiéndolos unos segundos en etanol. Posteriormente, se introdujeron en medio de cultivo DEMEM completo (Lonza), 20 % suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) inactivado (BioWhittaker, Lonza) complementado con 2 mM glutamina (Gibco) y 100 U/ml y 100 µg/ml penicilina-estreptomicina. En campana, se eliminó los restos de músculo y se cortó la epífisis. Con una jeringuilla se lavaron los tuétanos introduciendo y expulsando varias veces medio de cultivo hasta extraer completamente la médula ósea. El contenido se pasó a una placa Petri y se disgregó la médula. Las células obtenidas, se pasaron a un tubo de 50 ml a través de un filtro de nylon 50 µm (Cell Stainer, Falcon). Las células colectadas, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 min. El botón de células se suspendió en 10 ml de medio DEMEM 20 % FBS completo, y de nuevo se centrifugó. El nuevo botón de células se suspendió en 10 ml de medio DEMEM 20 % FBS complementado.

Para la diferenciación a MΦ, se distribuyeron $10 \cdot 10^6$ células (eritrocitos no incluidos) en 3 placas Petri con 10 ml de medio DEMEM complementado 20 % FBS, 20 ng/ml de Factor de Crecimiento de MΦ (M-CSF, R&D o SIGMA-ALDRICH). A las 72 h. se añadió 5 ml de medio DEMEM 20 % FBS complementado, 20 ng/ml M-CSF. Entre el 5-7 día, se lavaron las placas con PBS (Gibco, Ca⁺/Mg⁻). Las células diferenciadas a MΦ y adheridas a la placa fueron incubadas durante 7 min. a 37 °C con tripsina TryLE (Gibco). La tripsina fue neutralizada con FBS inactivado, y las células despegadas, suspendidas en 6 ml de medio DEMEM y centrifugadas a

1.200 rpm durante 10 min. El botón de células se suspendió en 10 ml de medio DEMEM 20 % FBS y se cultivó 24 h. a 37 °C, 5 % CO₂ en medio de cultivo RPMI 1.600 completo sin FBS.

7.- Activación de macrófagos de ratón.

Los macrófagos peritoneales obtenidos con TGC fueron sembrados a una concentración de $1,5 \cdot 10^6$ cel/pocillo en una placa 6 pocillos (Falcon) y mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 completo a 37 °C y 5 % CO₂ en un incubador humificado. Al día siguiente, se realizó un lavado de los pocillos con PBS a 37 °C para eliminar las células no adheridas y se añadió PMA 100 ng/ml, LPS puro 100 ng/ml (SIGMA-ALDRICH), *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* a diferentes intervalos de tiempo, o, 10 ng/ml de IFN γ (SIGMA-ALDRICH) en su caso.

8.- Aislamiento y activación de macrófagos humanos.

Los estudios realizados en Mo procedentes de sangre humana fueron aprobados por el comité de ética en experimentación humana de la Universidad de Granada, referencia 636. Todas las muestras fueron obtenidas de voluntarios sanos previamente informados y con el correspondiente consentimiento.

La sangre del donante fue recogida en tubos con heparina y diluida a partes iguales con PBS. En tubo 15 ml (Facon), se pusieron 4 ml de Histopaque® 1077 (SIGMA-ALDRICH) precalentado a 37 °C y sobre éste, 10 ml de sangre diluida en PBS (dejando caer por las paredes, evitando la mezcla). A continuación, se centrifugaron a 2.000 rpm a temperatura ambiente y durante 20 min. (centrífuga sin freno). Tras la separación, se obtuvieron distintas fracciones donde los eritrocitos y PMN se depositaron al fondo, a continuación se encontraba la fase de Histopaque®. Sobre ésta se encontraba un anillo blanquecino con las células mononucleares; linfocitos y Mo, y en la parte superior se hallaba el plasma junto con las plaquetas. Cuidadosamente, se retiró el plasma con una pipeta *pasteur* de plástico, se tomó el anillo celular, y se le realizó un lavado con 10 ml de PBS. Las células mononucleares fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente. El botón de células fue suspendido en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1.620 completo 10 % FBS y cultivado en

incubador a 37 °C, 5% CO₂ y un ambiente humificado durante 1 h. Después se realizaron varios lavados con PBS Ca²⁺/Mg²⁺ atemperado a 37 °C para eliminar las células no adheridas y se despegaron los Mo con 2 ml de tripsina (Gibco). Tras 2-5 min. a 37 °C, la tripsina fue neutralizada con FBS y las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS. Por último, se realizó un conteo con azul trypan (SIGMA-ALDRICH) para conocer el estado de las células y más tarde distribuidas en placas y cultivadas en medio de cultivo RPMI 1.620 completo con un 10 % FBS hasta su uso, en un periodo máximo de 24-48 h.

Los monocitos de sangre periférica fueron tratados con 10 ng/ml de IFN γ (SIGMA-ALDRICH) durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS a 37 °C y se añadió medio cultivo RPMI 1.620 10 % FBS completado con 2 mM glutamina (Gibco), 100 U/ml y 100 μ g/ml penicilina-estreptomicina (Gibco), 5 mM HEPES (Gibco) y 1 mM piruvato sódico (Gibco), y cultivado en incubador a 37 °C h. Posteriormente se procedió a añadir los distintos estímulos según se indica en cada momento.

9.- Medida de la producción de superóxido en macrófagos.

Se creció la bacteria, *Escherichia coli* F18, en medio *Luria Bertani* (LB, Invitrogen) y se calculó su concentración mediante un espectrofotómetro (Spectronic® Genesys™ 8, Spectronic Instrument) en función de su densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. El número de bacterias se calculó teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$0,1 \text{ D.O. } (\lambda_{600}) = 10^8 \text{ bacterias/ml}$$

Las bacterias fueron suspendidas en 800 μ l de PBS y posteriormente incubadas a 65 °C durante 1 h. para inactivarlas. Después se suspendieron en 500 μ l de PBS obteniendo así una concentración de 10⁷ bact en 50 μ l. A continuación, 10⁶ M Φ obtenidos del lavado peritoneal previo tratamiento con TGC fueron suspendidos en 1 ml de medio HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*: 0.137 M NaCl (SIGMA-ALDRICH), 5.4 mM KCl (SIGMA-ALDRICH), 0.25 mM Na₂HPO₄ (SIGMA-ALDRICH), 0.44 mM KH₂PO₄ (SIGMA-ALDRICH), 1.3 mM CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH), 1.0

mM MgSO₄ (SIGMA-ALDRICH), 4.2 mM NaHCO₃ (SIGMA-ALDRICH)) 5 % FBS (BioWhittaker, Lonza). Se añadió 20 µl del reactivo luminiscente (Lucigenin 1 µM, Fluka) y se midió la luminiscencia (T₀) en el luminómetro (Tecan Infinite F200). Los macrófagos fueron estabilizados a 37 °C durante 1 h. Se añadió la bacteria inactivada a diferentes diluciones: 1/25 y 1/50 y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se midió la luminiscencia cada 15 min durante las 2 primeras horas o hasta que el reactivo dejó de ser efectivo. La luminiscencia también fue medida en MΦ activados con 100 ng/ml de PMA (SIGMA-ALDRICH) a 37 °C. En este caso la producción de superóxido fue medida cada 15 min. durante la primera hora de incubación para estabilización, y cada 5 min. desde la activación en los primeros 15 min. y posteriormente a los intervalos indicados en cada momento.

La actividad Nox 2 se calcula a partir de las medidas de densitometría óptica (O.D.) sobre el tiempo cero de medida aplicando la:

$$\% \text{ de Actividad NOX 2} = (\text{O.D. } T_x / \text{O.D. } T_0) * 100 - 100$$

10.- Análisis por citometría de flujo.

El estudio de las poblaciones leucocitarias del peritoneo de ratón se realizó mediante citometría de flujo (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) usando anticuerpos monoclonales de los marcadores de superficie más característicos. Así, la suspensión celular obtenida del lavado peritoneal en ratones previamente tratados con Tioglicolato (TGC, SIGMA-ALDRICH) fue lavada con una solución de fosfatos amortiguadora (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, Gibco), durante 10 min. a 1500 rpm (revoluciones por minuto). Posteriormente, las células se suspendieron en PBS a una concentración de 1·10⁶ cel/ml. Se realizó un bloqueo de los receptores Fc (*Purified Rat anti-mouse CD16/CD32*, BD Pharmigen) durante 15 min. a 4 °C. Posteriormente, se añadió la batería de anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos (tabla 5), incubando éstos durante 30 min. a 4 °C en oscuridad. Después, las células fueron lavadas con PBS 0,5 % de albumina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA; SIGMA-ALDRICH) para eliminar el exceso de anticuerpo y fijadas con 0.5 % paraformaldehído (PFA,

Riedel-de Haën). La intensidad de fluorescencia fue detectada y analizada usando FACS (BD FACSCanto II Flow Cytometer).

Tabla 5 | **Anticuerpos utilizados en la caracterización de las poblaciones leucocitarias del peritoneo de ratón pretratado con TGC. Análisis realizado por FACS.**

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Clon	Compañía
Rat IgG2b anti-mouse CD2 (LFA-2)	Ficoeritrina (PE)	RM2-5	eBioscience
Arm Hamster IgG anti-mouse CD3e	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	1452C11	eBioscience
Rat IgG2a anti-mouse CD11a	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	M17/4	eBioscience
Rat IgG2b anti-mouse CD11b	Ficoeritrina (PE)	M1/70	eBioscience
Arm Hamster IgG anti-mouse CD11c	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	N418	eBioscience
Rat IgG2B anti-mouse Ly-6G (Gr1)	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	RB6-8C5	eBioscience
Rat IgG2a anti-mouse/human CD45R (B220)	Proteína Clorofila Peridina (PerCP-Cy5.5)	RA3-6B2	eBioscience
Rat IgG2a anti-mouse F4/80	Proteína Clorofila Peridina (PerCP o APC)	BN8	eBioscience
Rat IgM anti-mouse Ly-6C	Alofocianina APC-Cy7™ (APC)	AL-21	BD Pharmigen™
Rat IgG2b Isotype control	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	-	eBioscience
Rat IgG2a Isotype control	Ficoeritrina (PE)	-	eBioscience
Rat IgG2a Isotype control	PerCP-Cy5.5	-	eBioscience
Rat IgG2a Isotype control APC	Alofocianina APC-Cy7™ (APC)	RTK2758	BD Pharmigen™
Rat IgG2b anti-Mouse CD26/CD32	Purificado, Bloqueo de Receptor Fc	2.4G2	BD Pharmigen™

El estudio de SLAMF1 en los macrófagos peritoneales también se llevó a cabo por FACS siguiendo el procedimiento tal y como se detalla arriba. En este caso, se analizó la expresión de SLAMF1 en los macrófagos a las 3, 24 y 48 h. tras su obtención por lavado peritoneal después de 4º día de la inyección de TGC. Las células fueron cultivadas en medio cultivo RPMI 1.620 completo 10 % FBS en una placa Petri. Una vez concluido el tiempo determinado en cada placa, las células se realizaron varios lavados con PBS Ca²⁺/Mg²⁺ atemperado a 37 °C para eliminar las células no adheridas y se despegaron los MΦ con 2 ml de tripsina (Gibco). Tras 2-5 min. a 37 °C, la tripsina fue neutralizada con FBS y las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS y posteriormente teñidas con anti SLAMF1 (*Mouse Anti CD150-Phycoeritrina (PE)*, Clon: 9D1, eBioscience).

11.- Fagocitosis de *Escherichia coli*.

Los macrófagos peritoneales, obtenidos con TGC, *SLAMF8*^{-/-} y WT fueron cultivados en medio de cultivo RPMI 1.640 (Gibco) complementado con 0.5 % FBS descomplementado, 2 mM glutamina (Gibco), 100 U/ml y 100 µg/ml penicilina-estreptomina (Gibco), 5 mM HEPES (Gibco) y 1 mM piruvato sódico (Gibco) (RPMI 1640 Medio completo), a 37 °C y 5 % CO₂ en un incubador humificado (Termo Scientific). Al siguiente día, se realizó un lavado con PBS a 37 °C para eliminar las células no adheridas. Los macrófagos fueron distribuidos en tubos *ependorf* de 1,5 ml (1·10⁶ cels/tubo) y expuestos a *E. coli* que expresaba proteína verde fluorescente (*green fluoresce protein*, GFP) y fijada con PFA 4 % en medio RPMI 1640, 5 % FBS en un rotor y a 37 °C, a una relación 1/50 (MΦ/bacteria) a distintos tiempos. Se lavaron las células para eliminar la bacteria no incorporada y la fluorescencia de las bacterias adheridas a la superficie fue neutralizada con una solución tamponada que contenía azul tripán (SIGMA-ALDRICH) al 0,4 % durante 60 s. Se usaron MΦ fijados con PFA 4 % como control negativo de fagocitosis. Las muestras fueron fijadas en tampón con PFA al 05 % y analizadas en el citómetro de flujo FACS.

12.- Western Blot.

Una vez concluido el tiempo de activación de las células, se detuvo la activación con PBS frío y se añadió tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,6 (SIGMA-ALDRICH), NaCl 140 mM

(SIGMA-ALDRICH), EDTA 2mM (Merck), *Iodoacetamide* 10mM, *Sodium Pyrophosphate* 5mM (Sigma-Aldrich), *Sodium Orthovanadate* 1 mM (SIGMA-ALDRICH), *Phenylarsine oxide* 50µM (Sigma-Aldrich), *Sodium Fluoride* 50 mM (Sigma-Aldrich), NP-40 1 % (Fluka), *phenylmethanesulfonyl fluoride* 1 mM (PMSF, Sigma-Aldrich) y 10 % de un cóctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) y 5 % cóctel inhibidor de fosfatasa (*PhoSTOP*, Roche). Estos tres últimos componentes se añadieron justo antes de usar el tampón. Se incubó, al menos, 30 min. a 4 °C. Los extractos de las células lisadas fueron recogidos con un raspador (Biologix cell scrapper).

El cálculo de los extractos citosólicos fue determinado mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad) [201]. En cada lectura se usó BSA (Sigma-Aldrich) para elaborar la curva estándar y el cálculo de las muestras fue determinado a través de una regresión lineal.

Posteriormente, los extractos fueron sonicados en un tampón de carga (375 mM Tris-HCl, 12 % SDS (Serva), 30 % β-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH), 5 % glicerol y 0.1 % azul de bromofenol (SIGMA-ALDRICH)). La muestra fue desnaturalizada en un termo-bloque (Digital Dry Bath, Labnet International) a 95 °C durante 5 min. y cargada, en una cantidad equivalente de proteína, en un gel de acrilamida SDS/PAGE 10 %. En gel de bis-acrilamida (Bio-Rad) se usó TEMED (Merk) como iniciador de la polimerización y persulfato amónico como catalizador en un sistema de tampones discontinuos; la primera fase (TRIS-Cl pH 8.8,) para la acumulación de las proteínas hasta el frente de migración, y una segunda fase de separación (TRIS-Cl pH 6.8). La electroforesis (Fuente de alimentación y cubeta de BioRad) se llevó a cabo a 140 V, voltaje constante, durante 50 min. en un tampón de migración (25 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, 192 mM glicina (SIGMA-ALDRICH) y agua doble destilada). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar para el seguimiento de la migración de proteínas objeto de estudio (ProSieve). La transferencia húmeda a la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno, Bio-Rad) se realizó en un tampón de transferencia (20 mM Tris-HCl, 60 mM glicina, 20 % metanol y agua doble destilada) a 100 V, voltaje constante, durante 90 min. Las membranas fueron incubadas durante 1h. a temperatura ambiente, en agitación, con 10 % leche desnatada en TTBS (50 mM Tris-HCl pH: 7.6, 150 mM NaCl, *tween* 0,05 % (SIGMA-ALDRICH) y agua doble destilada). Tras 3 lavados con TTBS durante 10 min., las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario a una dilución 1/500 en TTBS 1 % leche desnatada durante la noche. Los anticuerpos utilizados fueron: anti p22^{phox} (C-17), Santa Cruz Biotechnology; anti p47^{phox} Ab (H-195), Santa Cruz Biotechnology; anti *Phospho-(Ser) PKC substrate Ab*, Cell Signaling TECHNOLOGY; anti

Phospho-p40phox (Thr154) Ab, *Cell Signaling TECHNOLOGY*; anti phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Ab (3D7), *Cell Signaling TECHNOLOGY*; p38 α/β MAPK (H-147), Santa Cruz Biotechnology; o anti β -actin Ab, Sigma-Aldrich. Al día siguiente, tras 3 lavados con TTBS por 10 min., las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Anti-mouse/Anti-rabbit conjugate HRP*, GE Healthcare) a una dilución 1/5.000 en TTBS 1 % leche desnatada.

La detección de las bandas se realizó por un método de quimioluminiscencia [202] usando reactivos comerciales (ECLplus, Amersham, GE Healthcare). Las imágenes fueron recogidas por un sistema de captación de quimioluminiscencia (LAS-4000 mini, Fujifilm). Los niveles de expresión de las distintas proteínas fueron analizados por densitometría, corrigiendo la carga con los niveles de β -actina presentes en la muestra, con el programa informático Multi-Gauge (V3.0, Fujifilm) aplicando una corrección con respecto al control de carga según la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de la Banda} = \frac{\text{Densidad de la muestra relativa al control (M}\Phi \text{ sin activar)}}{\text{Densidad del control de carga relativa al control}}$$

13.- Estudio de la translocación de RAC GTPasa a la membrana.

Los macrófagos peritoneales obtenidos con TGC fueron sembrados en placas Petri a una concentración de $4,5 \cdot 10^6$ cel/placa y mantenidos en medio de cultivo RPMI 1.640 completo en un incubador humificado. A las 48 h. se realizó un lavado de las placas con PBS a 37 °C para eliminar las células no adheridas y se añadió PMA 100 ng/ml a diferentes intervalos de tiempo. Una vez activadas las células, se detuvo la activación con PBS frío y se lisaron las células en hielo durante 30 min. con un tampón que contenía 100mM HEPES (pH 7,3) , 100 mM KCl , 3 mM NaCl , 3 mM MgCl₂ , 1,25 mM EGTA (SIGMA-ALDRICH) y 10 % de cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Después, las células fueron sonicadas (Ultraschallprocessor UP200H, Dr. Hielscher, Teltow, Germany) tres veces durante 5 s. a 50 A separadas por intervalos de 30 s. Se eliminaron los detritos y las células íntegras al centrifugar durante 5 min. a 10.000g a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos

fueron centrifugados en una ultracentrífuga a 100.000 g. durante 30 min. a 4 °C. El sobrenadante obtenido constituía la fracción citosólica. El botón precipitado fue solubilizado con un tampón formado por 120 mM NaH₂PO₄, pH 7,4 (Sigma-Aldrich), 1 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 1 mM EGTA, 1 mM *dithiothreitol*, 20 % glicerol, 40 mM *octylglucoside* (Sigma-Aldrich), 10% de cóctel de inhibidores de proteasas y centrifugado durante 40 min. a 20.000 g. a 4 °C, constituyendo la fracción membrana solubilizada.

14.- Inmunofluorescencia.

Los macrófagos peritoneales obtenidos con TGC (SIGMA-ALDRICH) fueron distribuidos 10.000 cel/pocillo en porta-objetos con celdillas (Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover, RS Glass Slide Sterile, Nalge Nunc International) y mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) complementado con 0.5 % FBS descomplementado, glutamina, penicilina-estreptomina, HEPES y piruvato sódico a 37 °C y 5 % CO₂ en un incubador humificado. Al siguiente día, se realizó un lavado de los pocillos con PBS (Gibco) a 37 °C para eliminar las células no adheridas. Los macrófagos adheridos se activaron con PMA 100 ng/ml (SIGMA-ALDRICH) a diferentes tiempos. Una vez transcurrido el tiempo, la activación fue detenida con PBS frío. Estas células se fijaron con PFA 1 % (SIGMA-ALDRICH), se permeabilizaron con Triton 100X 0,1 % (Paveac) y se bloquearon con una solución de PBS con BSA 2 % (Sigma-Aldrich) y solución con suero de ratón 2 % (BALB/c WT o *SLAMF8*^{-/-}). Los macrófagos se incubaron durante 4 h. a temperatura ambiente con el antígeno primario (anti p22^{phox} (C-17), Santa Cruz Biotechnology y anti p47^{phox} (H-195), Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1/50 en PBS. Tras lavar con PBS, se añadió el anticuerpo secundario marcado con diferentes fluorocromos (*donkey anti-goat* FITC de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución 1/500 para p22^{phox} y Alexa Fluor 488 F(ab')₂ *fragment of anti-rabbit* (H+L) de Invitrogen a una dilución 1/100 para p47^{phox}) durante 1 h. a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas con medio de montaje (*Vectashield*, *Vector Laboratories*) que contiene DAPI, y más tarde visualizadas por microscopía confocal (microscopio de fluorescencia LEICA DM5500B).

El análisis de la inmunofluorescencia se realizó utilizando el programa informático *Leica Application Suite* (*Leica Microsystems*) examinando la media de fluorescencia de las células fotografiadas.

15.- Determinación de la actividad microbica *in vivo*.

Se creció bacteria *Salmonella typhimurium* y *S. typhimurium* SEEB (cepa de *Salmonella* atenuada resistente a kanamicina) en medio LB durante la noche. Al día siguiente, se determinó la concentración de bacteria en función de su densidad óptica, a una longitud de onda de 600 nm (Spectronic® Genesys™ 8, Spectronic Instrument) y se inyectaron $5 \cdot 10^4$ bact/200 μ l PBS de cada cepa en el peritoneo de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y WT. Pasadas 24 h. los ratones fueron sacrificados. Se extrajo el bazo y el hígado, que fueron homogeneizados en ddH₂O. Diferentes diluciones del órgano disgregado fueron sembradas en placas de LB con y sin kanamicina y se incubaron a 37 °C. Al día siguiente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se calculó el número de UFC por ml según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = (\text{N}^\circ \text{ Colonias} * 1/\text{Factor Dilución} * 1/ \text{Volumen})$$

16.- Análisis estadístico.

Los estudios estadísticos se realizaron en el programa informático GraphPad Prism 4. Se aplicó la prueba t de Student para estudios paramétricos y la prueba de U Mann-Whitney para muestras no paramétricas independientes. Las muestras se consideraron significativamente diferentes para un valor p menor o igual a 0.05. El mínimo de datos analizados por muestra fue, en todo los caso, igual o mayor a 3.

RESULTADOS

1.- Genotipo de los ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-}.

Los ratones BALB/c deficientes en *SLAMF8* fueron cedidos gentilmente por el Dr. Terhorst (*Harvard Medical School, Immunology Division, Boston, MA*) a nuestro laboratorio. Los ratones fueron mantenidos en condiciones limitadas de patógenos (*SPF, specific pathogen free*) en el animalario del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Estos ratones no mostraron diferencias significativas en cuanto a reproducción o comportamiento. La confirmación y seguimiento del genotipo de los ratones deficientes para *SLAMF8* (*SLAMF8*^{-/-}) se realizó mediante una PCR convencional de DNA genómico obtenido de la cola del ratón. En las muestras de DNA de los ratones salvajes (WT) se amplificó una banda de 420 pares de bases (*pb, base pairs*) correspondiente al fragmento de DNA genómico comprendido entre los exones 1 y 2 del gen *SLAMF8*. En el caso de los ratones *SLAMF8*^{-/-} se amplificó el *cassette* de resistencia a la neomicina (MC1neo), obteniéndose una banda de 850bp correspondiente a un fragmento entre el exón 1 y el gen para neomicina insertado, que sustituye al fragmento génico entre los exones 2 a 4 deletados (Fig. 1). Este fragmento codifica para los dominios extra-citoplasmático y transmembrana del *SLAMF8*. En el caso de ratones heterocigotos ambos productos fueron amplificados a partir de DNA genómico (Fig. 2).

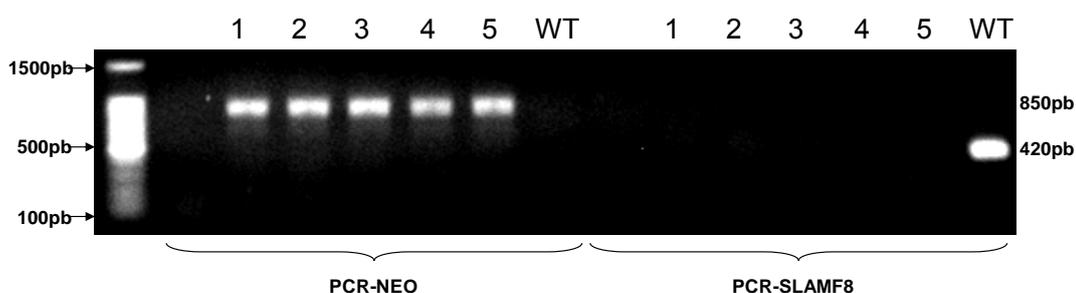


Figura 1 | **Genotipado de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-}**. PCR de DNA genómico obtenido a partir de DNA de la cola de ratones WT y *SLAMF8*^{-/-}. En las muestras de los ratones WT se amplificó un fragmento del gen *Slamf8* (420 pb), en cambio, en los ratones *SLAMF8*^{-/-} se amplificó un fragmento con un tamaño superior (850 pb) correspondiente al *cassette* que sustituyó a un fragmento de dicho gen original. La falta de amplificación del gen WT en los ratones *SLAMF8*^{-/-} indica que los ratones son homocigóticos para el gen de neomicina.

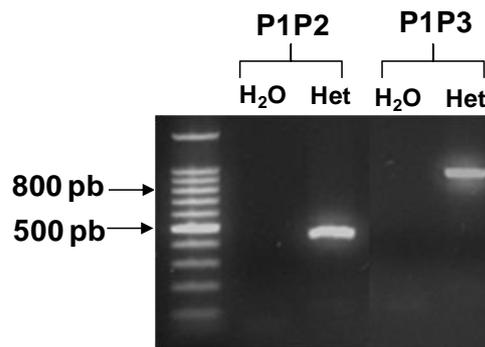


Figura 2 | **Genotipado de ratones heterocigotos BALB/c *SLAMF8*^{+/-}**. PCR de DNA genómico obtenido a partir de la cola de ratones heterocigotos. En las muestras de estos ratones se amplificaron ambos fragmentos, el gen *Slamf8* (420 pb) y el de 850 pb correspondiente al *cassette* que sustituyó al fragmento original de dicho gen. P1, P2 y P3 corresponde a los oligos utilizados (ver material y métodos). La amplificación de ambos productos indica la presencia de ambos alelos.

Para confirmar que los ratones no expresaban ningún péptido o proteína truncada que pudiera ser funcional, se analizó la expresión de exones para *SLAMF8* en los ratones WT y *SLAMF8*^{-/-}, amplificando *Slamf8* a partir de RNA aislado del bazo (Fig. 3). Recordemos que la construcción para producir el ratón *SLAMF8*^{-/-} eliminó los exones 2 a 4 (ver material y métodos). En la figura 2 se muestran los distintos productos que pueden producir los exones del gen original. Sólo en el caso del DNA procedente de los ratones WT se observa amplificación de RNA en las distintas combinaciones realizadas, lo que indica que no hay trazas de proteína en los ratones *SLAMF8*^{-/-} que pudieran enmascarar el fenotipo que se observase posteriormente.

Es importante destacar en este punto, que los ratones *SLAMF8*^{-/-} no presentaron ningún tipo de enfermedad espontánea o inflamatoria. Tampoco mostraron diferencias en cuanto al desarrollo de poblaciones leucocitarias, respuesta inmunitaria frente a antígenos T dependientes o T independientes, o activación y diferenciación de las células T o B (datos no mostrados y realizados por la Dra. A. Abadía Molina).

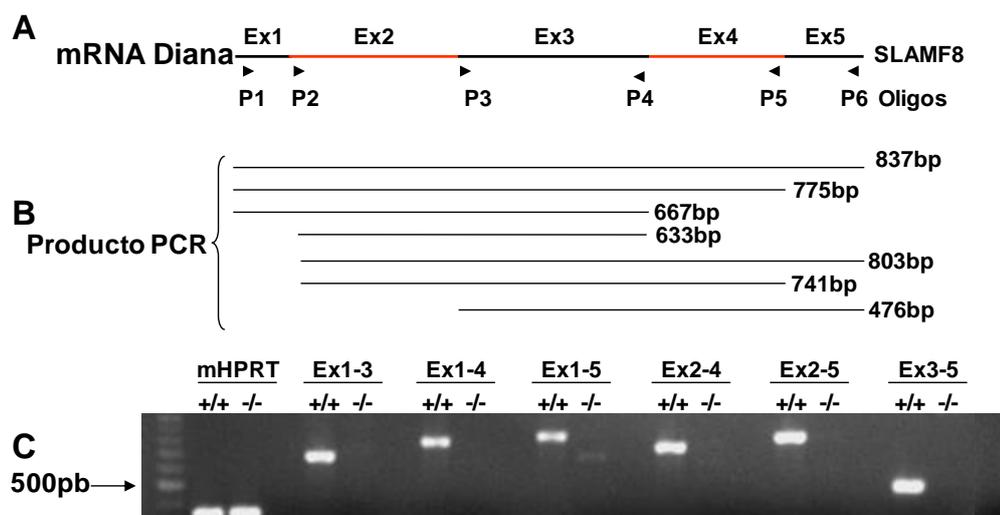


Figura 3 | RT-PCR de los exones de SLAMF8 en ratones BALB/c WT y SLAMF8^{-/-} (Slamf8^{ΔE2-4}). A) Esquema de los cebadores usados para la amplificación de los exones de Slamf8. B) Tamaño del producto PCR de las diferentes combinaciones de los exones. C) Gel de agarosa de una RT-PCR de los 5 exones que componen Slamf8 a partir de RNA aislado de bazo procedente de ratones BALB/c SLAMF8^{-/-} y WT. Los ratones SLAMF8^{-/-} no amplifican ningún productos observados en los ratones WT, indicativo de no expresión de la proteína.

2.- Estudio de la producción de superóxido en ratones SLAMF8^{-/-}.

En estudios realizados en otros miembros de la familia del SLAM, SLAMF1 y LY108, se ha observado que la actividad microbicida de MΦ y neutrófilos, deficientes respectivamente en estas proteínas, es inferior *in vivo* e *in vitro* [110, 133, 203]. Según resultados previos, SLAMF8 se expresa sobre todo en Mo y MΦ [20, 204], lo que nos hizo pensar que éste pudiera estar implicado en la función microbicida de la misma manera. Estudiamos en primer lugar la producción de superóxido (O₂^{•-}) en los MΦ en ausencia de SLAMF8 [205]. Para ello se utilizó una técnica basada en la detección de anión O₂^{•-} con el reactivo luminiscente lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio). La lucigenina es una sonda quimioluminiscente utilizada para la detección de O₂^{•-} generado de manera endógena en las célula. Esta molécula es reducida por el O₂^{•-} dando lugar a una nueva forma que presenta una quimioluminiscencia amplificada que puede ser medida y correlacionada con la cantidad de O₂^{•-} presente en el sistema. Así, la

producción de $O_2^{\bullet-}$ puede ser cuantificada de manera proporcional a la activación de la NADPH oxidasa. Primero se midió la producción de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ peritoneales obtenidos con TGC de ratones *SLAMF8*^{-/-} y WT tratados con PMA (*phorbol myristate acetate*), un potente activador de la NADPH oxidasa [151]. De manera muy llamativa, la producción de $O_2^{\bullet-}$ en respuesta al PMA fue significativamente más alta en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} respecto a los WT, llegando a triplicarse (Fig. 4A). Con objeto de determinar si este fenómeno se observaba cuando los MΦ eran activados por otro estímulo, la producción de $O_2^{\bullet-}$ también fue estudiada en respuesta a bacteria GRAM negativa *E. coli* (F18). Del mismo modo la producción de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ *SLAMF8*^{-/-}, en comparación con los MΦ WT, fue significativamente mayor (Fig. 4B).

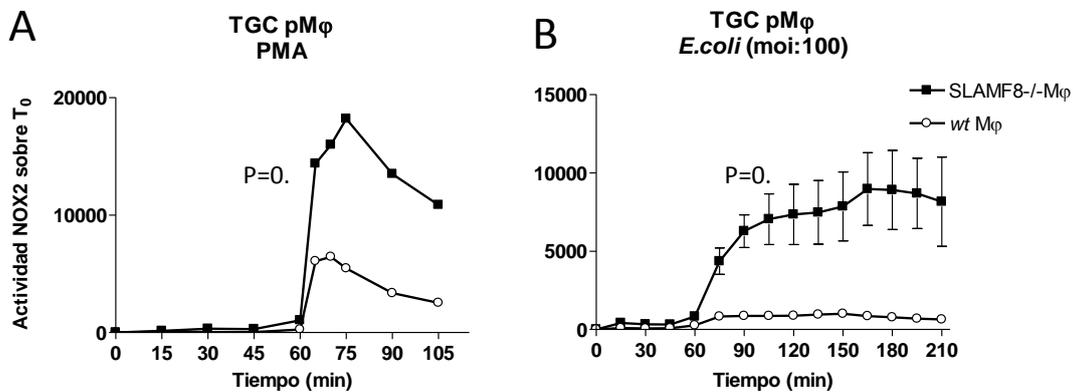


Figura 4 | **Detección de la generación de $O_2^{\bullet-}$ usando quimioluminiscencia amplificada por lucigenina en macrófagos *SLAMF8*^{-/-} y salvajes.** (A) Generación de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ tras estimulación con PMA (100 ng/ml). (B) Generación de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ tras activación con *E. coli*. Al igual que cuando son activados con PMA, los MΦ *SLAMF8*^{-/-} muestran mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ que los MΦ WT tras ser activados con *E. coli*. Ambos estímulos fueron añadidos en el punto de 60 min. Ambos ensayos fueron realizados por triplicado, $P < 0.0001$. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Una vez observado este fenotipo quisimos confirmarlo analizando la activación de los MΦ en distintas condiciones. Para ello se estimularon MΦ peritoneales con PMA a una concentración mayor. Además, los MΦ fueron estimulados con bacterias GRAM negativas *E. coli* a una dosis infectiva más baja (*multiplicity of infection*, MOI: 50). En ambos casos se

obtuvieron diferencias, siendo la producción de $O_2^{\bullet-}$ significativamente mayor en los MΦ procedentes de ratones *SLAMF8*^{-/-} que en los WT (Fig. 5A y 5B).

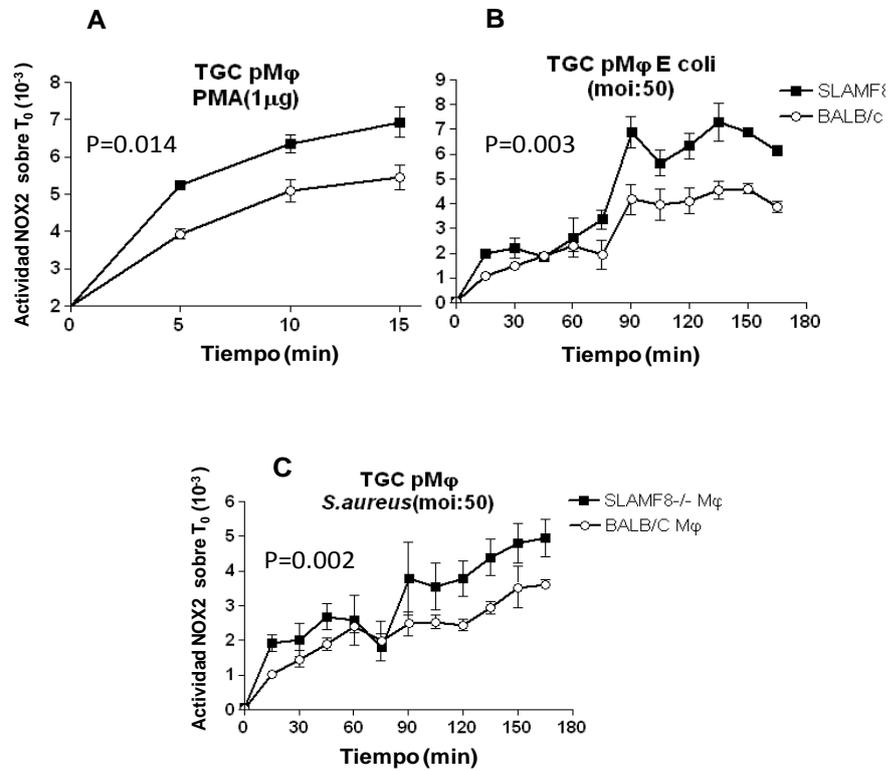


Figura 5 | **Detección de la generación de $O_2^{\bullet-}$ usando quimioluminiscencia amplificada por luciferina en macrófagos *SLAMF8*^{-/-} y salvajes.** (A) Generación de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ tras estimulación con PMA (1 μg/ml); (B) Generación de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ tras activación con *E. coli*. (MOI: 50); (C) Generación de $O_2^{\bullet-}$ en MΦ tras activación con *S. aureus* (MOI: 50). Los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} muestran en todos los casos una producción de $O_2^{\bullet-}$ significativamente mayor que los MΦ WT. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Con objeto de determinar si el fenotipo era específico para bacterias GRAM negativas, se estimularon MΦ peritoneales con la bacteria GRAM positiva, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Al contrario de lo que ocurre con SLAMF1, donde el fenotipo se observa solo con bacterias GRAM negativas [110, 203], los MΦ *SLAMF8*^{-/-} mostraron una producción de O₂^{•-} significativamente mayor respecto a los MΦ WT cuando fueron estimulados con *S. aureus* (Fig. 5C). Todos estos resultados indican que SLAMF8 de alguna manera modula negativamente la producción de O₂^{•-}, independientemente del agente que provoca el estímulo.

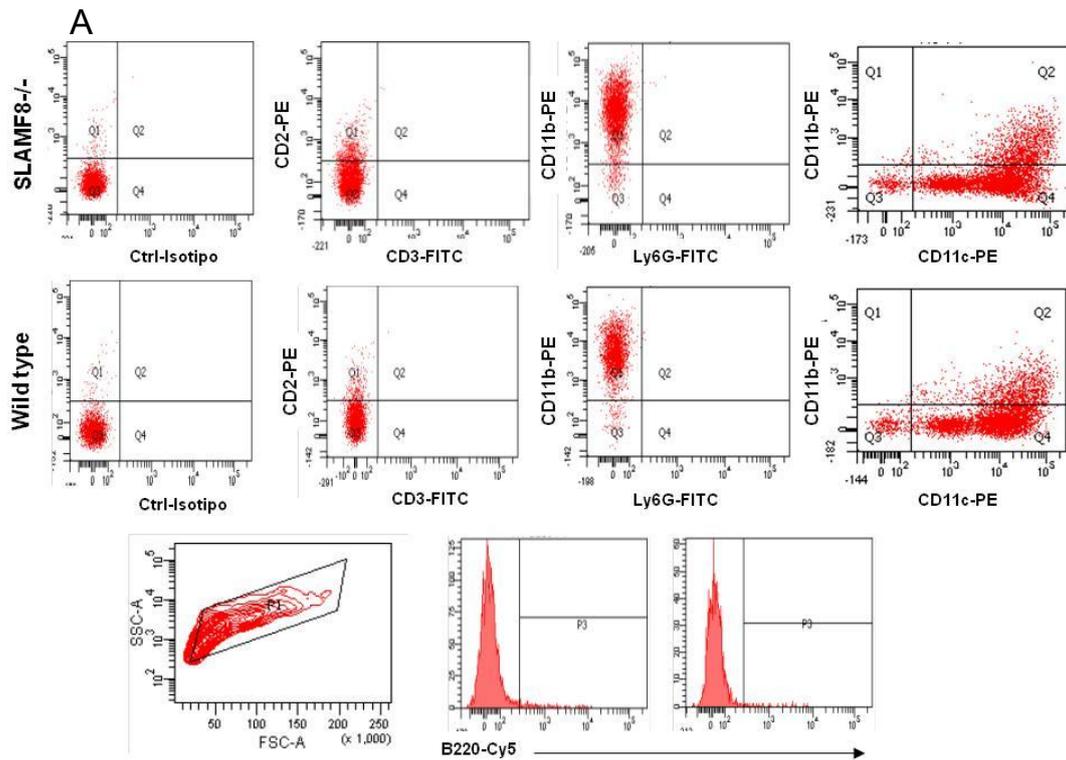
Tabla 1 | **Marcadores característicos de las principales poblaciones peritoneales de ratón.**

Marcador	Célula	Descripción
CD2	Linfocitos de ratón (Células B y T)	Receptor de superficie celular (50-55KDa)
CD3e	Células T	Subunidad ε del complejo TCR (20KDa)
CD11a	Todos los leucocitos	Integrina α _L asociada no covalentemente a la integrina β ₂ (180KDa)
CD11b	MΦ, células NK, granulocitos, linfocitos activados y Células B-1	Integrina α _M non-covalently associates with β ₂ integrin (165-170KDa)
CD11c	Células Dendríticas (y una población de linfocitos epiteliales del intestino y algunas Células T activadas)	Integrina α _X asociada no covalentemente a la integrina β ₂ (90KDa, heterodímero CD11c/CD18).
Gr1 (Ly6G)	Neutrófilos (y granulocitos de médula ósea) y monocitos RB6.8C5 detecta Ly-6G e isoforma de Ly6c (Daley et al, 2008)	Antígeno de diferenciación mielóide (21-25KDa)
B220	Células B (algunas T activadas, C. killer activadas con linfoquina-LAK, progenitores NK de la médula ósea)	CD45R (220KDa)
F4/80	MΦ (Células Langerhans y células hepáticas de Kuffer)	Proteína Transmembrana (125KDa)
Ly6C	Mo/ MΦ, granulocitos, Células endoteliales, Células plasmáticas y timocitos	Antígeno superficie membrana unido por GPI (14-17KDa)

3.- Estudio de las poblaciones peritoneales tras inyección con TGC.

Hasta aquí todos los resultados muestran una mayor actividad la NADPH oxidasa en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} ante cualquier estímulo. Aunque resultados previos no mostraron diferencias en las distintas poblaciones leucocitarias entre los ratones *SLAMF8*^{-/-} y los WT, quisimos determinar si el fenotipo observado se debe a diferencias en las proporciones en que aparecen las poblaciones del lavado peritoneal, ya que una mayor presencia de neutrófilos o MΦ en en las muestras podría ser la causante de las diferencias observadas en la producción de O₂^{•-}. Se hizo un estudio de las poblaciones leucocitarias mediante anticuerpos monoclonales característicos de las principales poblaciones de origen hematopoyético (Fig. 6), y se analizó mediante citometría de flujo (tabla 1). La combinación de estos marcadores nos permite distinguir la poblaciones de: MΦ (CD11b⁺F4/80⁺Ly6c^{-/+}), Mo (CD11b⁺Ly6c⁺F4/80⁻), neutrófilos (CD11b⁺CD11a⁺Ly6G⁺F4/80⁻), células dendríticas (CD11B^{+/-}Ly6c⁺CD11c⁺F4/80⁻), células B (B220) y linfocitos (CD2⁺CD3^{+/-})(Fig. 6 y 7).

En estos ensayos no se observaron diferencias significativas en ambas poblaciones peritoneales obtenidas con TGC. Como rutina se analizaban las principales poblaciones en cada experimento para asegurar que las proporciones eran similares y así poder comparar resultados. En la figuras 6 y 7 se muestra el fenotipo correspondiente a las poblaciones obtenidas en los experimentos, observándose un bajo porcentaje de células B y T y neutrófilos una pequeña proporción de Mo CD11b⁺F4/80^{low}Ly6c^{low} y células dendríticas con un predominio de MΦ CD11b⁺F4/80⁺ (Fig. 7).



B

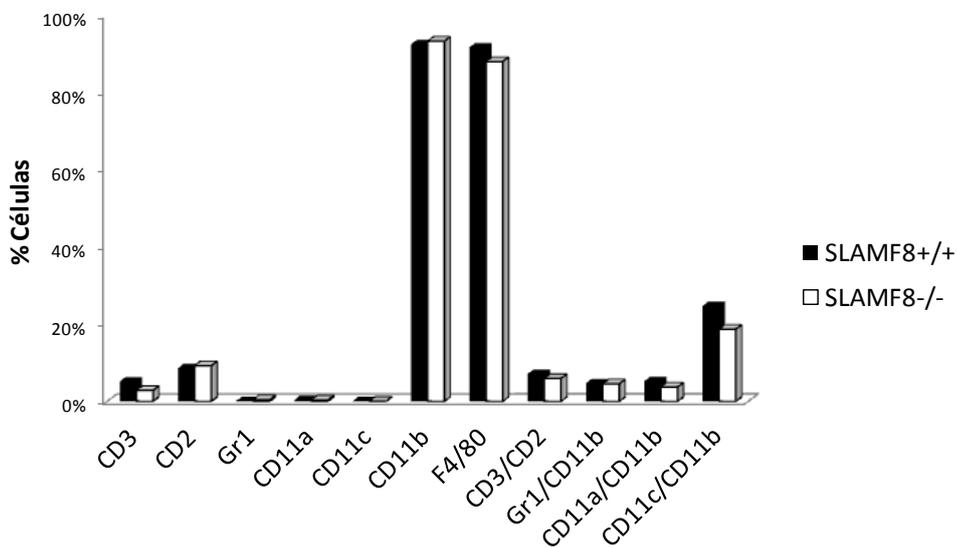


Figura 6 | Principales poblaciones de origen hematopoyético de las células peritoneales de ratón obtenidas con TGC en BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y salvajes. (A) Análisis representativo sobre el fenotipo realizado en los extractos de peritoneo tratado con TGC, y (B) Diagrama de barras realizado por citometría de flujo de al menos al 90% de las extracciones de células peritoneales de ratón obtenidas tras inyección con TGC. No se observan diferencias significativas entre las poblaciones peritoneales de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y WT, siendo las células obtenidas principalmente MΦ CD11b⁺F4/80⁺.

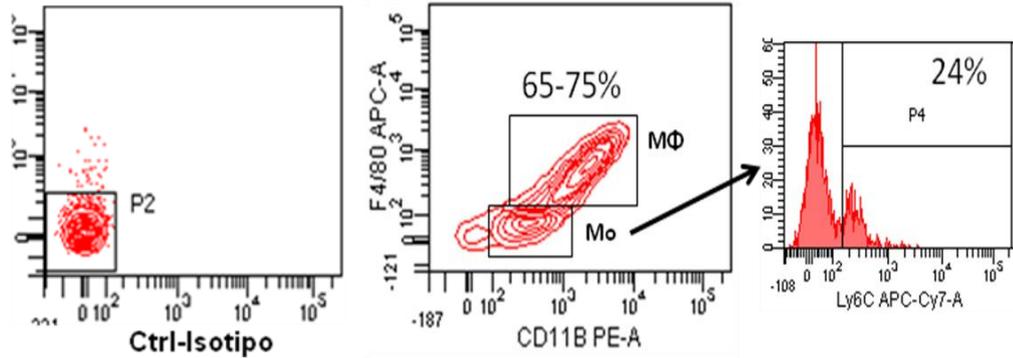


Figura 7 | Análisis de las poblaciones peritoneales $CD11b^+F4/80^{low/-}Ly6c^+$ y $CD11b^+F4/80^+$ de ratón obtenidas con TGC en BALB/c $SLAMF8^{-/-}$ y salvajes. (A) Análisis representativo sobre el fenotipo realizado en los extractos de peritoneo tratado con TGC, realizado por citometría de flujo de al menos al 90% de las extracciones de células peritoneales de ratón obtenidas tras inyección con TGC. No se observan diferencias significativas entre las poblaciones peritoneales de ratones BALB/c $SLAMF8^{-/-}$ y WT, siendo las células obtenidas principalmente $M\Phi CD11b^+F4/80^+$ y una menor proporción de $Mo F480^+CD11b^{low}LY6c^{+/-}$

4.- Fagocitosis en macrófagos peritoneales $SLAMF8^{-/-}$ obtenidos con TCG.

La fagocitosis es un mecanismo esencial que utilizan los $M\Phi$ y otros fagocitos para la eliminación de los microorganismos patógenos. Los patógenos invasores son inicialmente neutralizados por una batería de proteínas circulantes del hospedador, y más tarde eliminados por los fagocitos una vez han sido internalizados. El proceso inmediato tras la fagocitosis es la denominada “explosión oxidativa” catalizada por la NADPH oxidasa [206].

Con objeto de determinar si la mayor actividad la NADPH oxidasa en los $M\Phi SLAMF8^{-/-}$ se debe a una mayor fagocitosis, estudiamos, mediante citometría de flujo, la capacidad fagocítica de los $M\Phi$ aislados de peritoneo. Para responder a esta cuestión se estudió la fagocitosis a distintos tiempos en $M\Phi$ peritoneales, $SLAMF8^{-/-}$ y WT obtenidos con TGC, utilizando bacterias *E. coli* y *S. aureus* que expresaban GFP. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la capacidad fagocítica de *E. coli* y *S. aureus* entre los $M\Phi SLAMF8^{-/-}$

^{-/-} y MΦ WT (Fig. 8). Este hecho pone de manifiesto que el fenotipo observado se debe a una modulación sobre la actividad de la NADPH oxidasa y no como consecuencia de una la capacidad fagocítica de los MΦ *SLAMF8*^{-/-} esté incrementada.

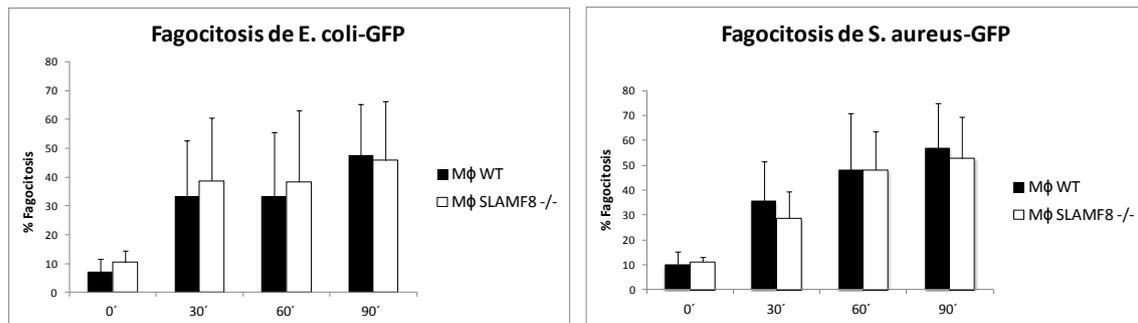


Figura 8 | **Fagocitosis de *E. coli-GFP* y *S. aureus-GFP* en macrófagos peritoneales deficientes en *SLAMF8*^{-/-} y salvajes.** Los Macrófagos peritoneales, obtenidos con TGC, *SLAMF8*^{-/-} fagocitan tanto *E. coli* como *S. aureus* de manera similar a los MΦ peritoneales de ratones WT. Este ensayo fue analizado por citometría de flujo. Ensayo representativo de 4 experimentos realizados de manera independiente.

5.- Expresión de SLAMF1 (CD150) en macrófagos peritoneales de ratón.

Los miembros de la familia del SLAM se encuentran agrupados en un mismo *locus*; en el cromosoma 1q21-24 en humano, o bien, en el cromosoma 1 en ratón [5]. Nos preguntamos si el fenotipo observado en los ratones *SLAMF8*^{-/-} sería una consecuencia de una modificación en la expresión de SLAMF1 en estos ratones, debido la inserción del gen de neomicina próximo al locus de genes para los SLAM o realmente por la falta de expresión de SLAMF8.

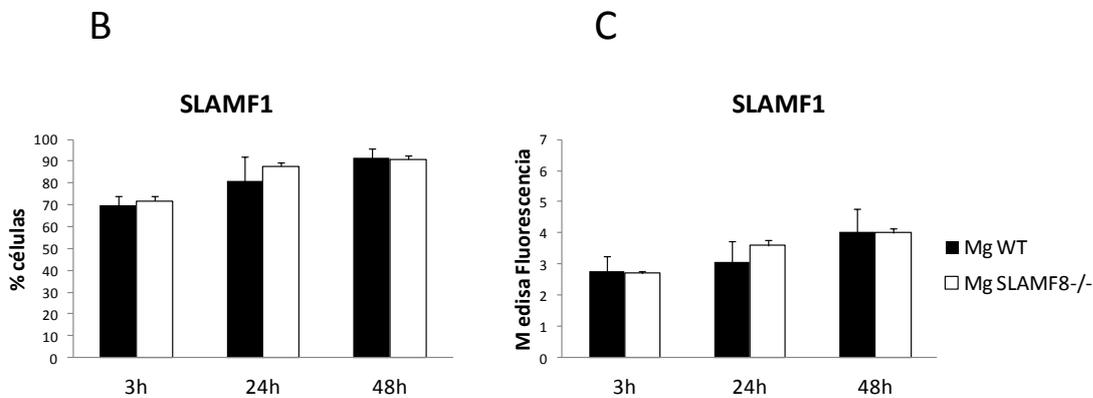
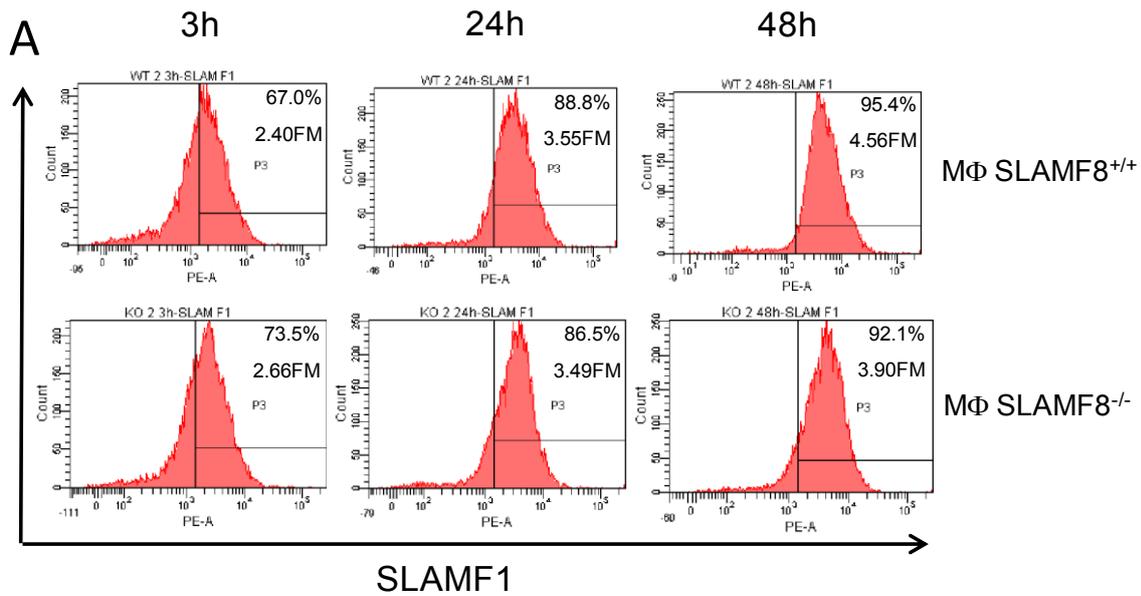


Figura 9 | Estudio de la expresión de SLAMF1 en macrófagos peritoneales, obtenidos con TGC, a distintos tiempos de su extracción. (A) Análisis por FACS en el que se comparan el porcentaje de MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT que expresan SLAMF1 (B) a distintos tiempos de su extracción, así como la media de fluorescencia (C). No se observaron diferencias significativas en la expresión de SLAMF1 a diferentes tiempos desde su extracción de la cavidad peritoneal en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT. Ensayo representativo de 3 experimentos realizados de manera independiente.

El principal candidato objeto de estudio fue SLAMF1 (CD150) ya que éste tiene un papel modulador positivo sobre el complejo NADPH oxidasa [7], función opuesta a la observada para SLAMF8. Para aclarar esta cuestión, se estudió la expresión de SLAMF1 por citometría de flujo a diferentes tiempos en MΦ peritoneales obtenidos con TGC (Fig. 8). En estos experimentos no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de SLAMF1,

tanto en el porcentaje de células que lo expresaban como en la media de fluorescencia, que pudiera condicionar la función del MΦ (Fig. 9B y 9C).

6.- ESTUDIO DE LAS RUTAS DE ACTIVACIÓN DE NADPH OXIDASA EN MACRÓFAGOS DE RATÓN PROCEDENTES DE RATONES *SLAMF8*^{-/-}.

Diferentes estudios realizados sostienen que la fosforilación y reclutamiento de p47^{phox} es clave en la activación de la NADPH oxidasa. Este proceso está regulado por diferentes quinasas, incluidas la proteína quinasa C (PKC), PI3K y p38 MAPK, indicadas además como rutas principales y comunes a diferentes estímulos. Con el objetivo de conocer que vías de activación del complejo NADPH oxidasa están modificadas en ausencia de *SLAMF8*, se analizó en primer lugar la activación de las subunidades fosforiladas p47^{phox} y p40^{phox}, subunidades citosólicas y sustratos directos del enzima PKC. Se estudió además la movilización a membrana de p47^{phox} y ensamblaje de p22^{phox} mediante inmunofluorescencia. Con el mismo objetivo, en este capítulo mostramos también el estudio de la movilización de RAC1/2 GTPasa a la membrana, proteína necesaria para la producción de O₂^{•-} ya que se ensambla con p67^{phox} y es crucial para el transporte de electrones. Se analizó además la activación de p38 MAPK, quinasa que activa números procesos en MΦ y que se ha relacionado con la activación de NADPH oxidasa [7], 1,2 nueva.

6.1.- Estudio de la fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} por PKC en la activación de NADPH oxidasa.

La fosforilación y reclutamiento de las subunidades citoplasmáticas que componen el enzima NADPH oxidasa son claves para el ensamblaje con el citocromo *b₅₅₈*, formación del complejo y la consecuente producción de O₂^{•-} [15, 151, 162-166, 171, 207-209]. Hace casi dos décadas que se viene describiendo la fosforilación en serinas (Ser) y treoninas (Thr) de las subunidades citosólicas p40^{phox} y p47^{phox} por la PKC como una de las principales quinasas que induce la activación del complejo.

Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran una mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}, es lógico pensar que en estos MΦ haya una mayor fosforilación de estas subunidades por esta vía. Para resolver esta cuestión, se estudió mediante *Western Blot* la fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox}, en MΦ peritoneales tratados con TGC, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente un motivo de fosforilación en Ser por la PKC [15, 210, 211]. Confirmando nuestra sospecha, en estos ensayos se observó que los MΦ *SLAMF8*^{-/-} mostraban mayor cantidad de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas tras estimular con PMA (Fig. 10)

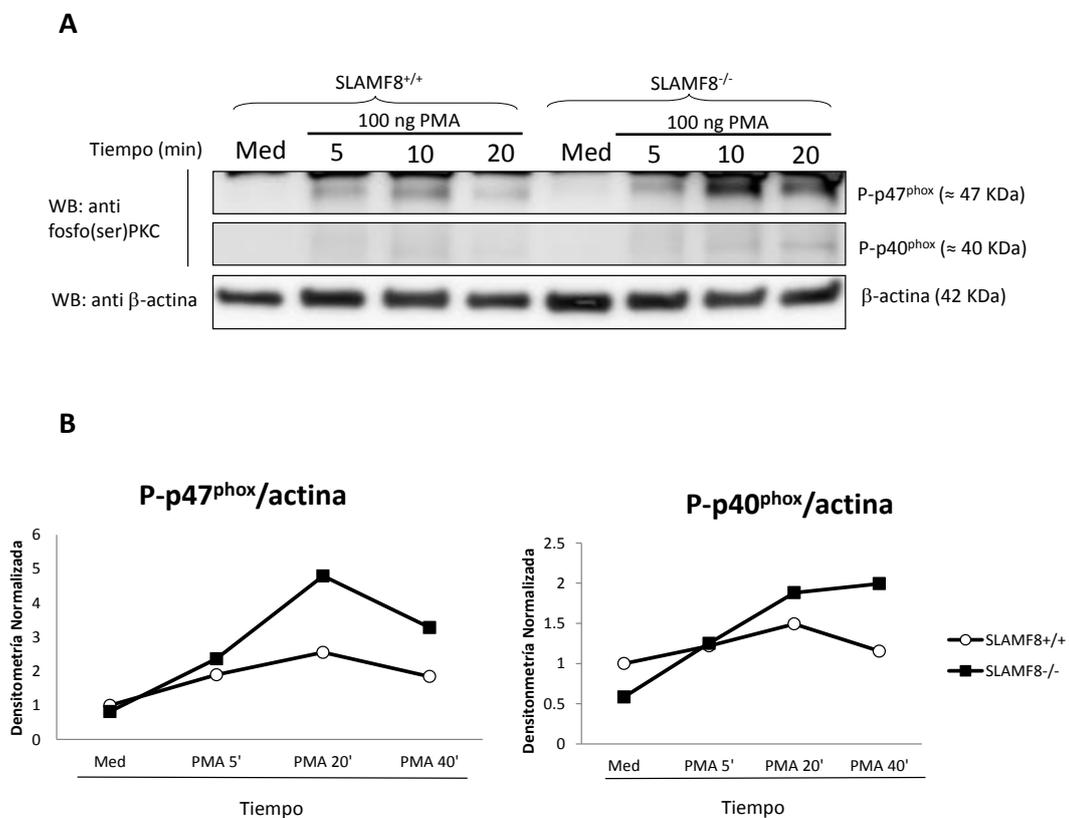


Figura 10 | Fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} por la PKC en macrófagos peritoneales de ratón obtenidos con TGC y estimulados con PMA. (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} y p40^{phox} fosforilado con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, sustratos de la PKC, en MΦ peritoneales activados con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. La ausencia de *SLAMF8* en MΦ muestra una mayor fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} por la PKC respecto a los MΦ salvajes tras ser estimulados con PMA. El experimento mostrado es representativo de 10 experimentos realizados.

Está más que constatado que el PMA es un potente activador directo de las distintas isoenzimas de PKC descritas [209, 212], no obstante, es más fisiológico activar con bacteria completa y confirmar si en estas condiciones la PKC estaría también implicada. Como se observa en la figura 10 y 11, la fosforilación de ambas subunidades, p40^{phox} y p47^{phox}, fue mayor en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} activados con bacteria Gram negativa *E. coli* (Fig. 11), así como con bacteria Gram positiva *S. aureus*, en comparación con los MΦ salvajes (Fig. 12). Estos resultados confirman que la falta de expresión de SLAMF8 regula la activación de la NADPH oxidasa través de la fosforilación de sus subunidades citoplasmáticas dependiente de PKC, independientemente del estímulo utilizado

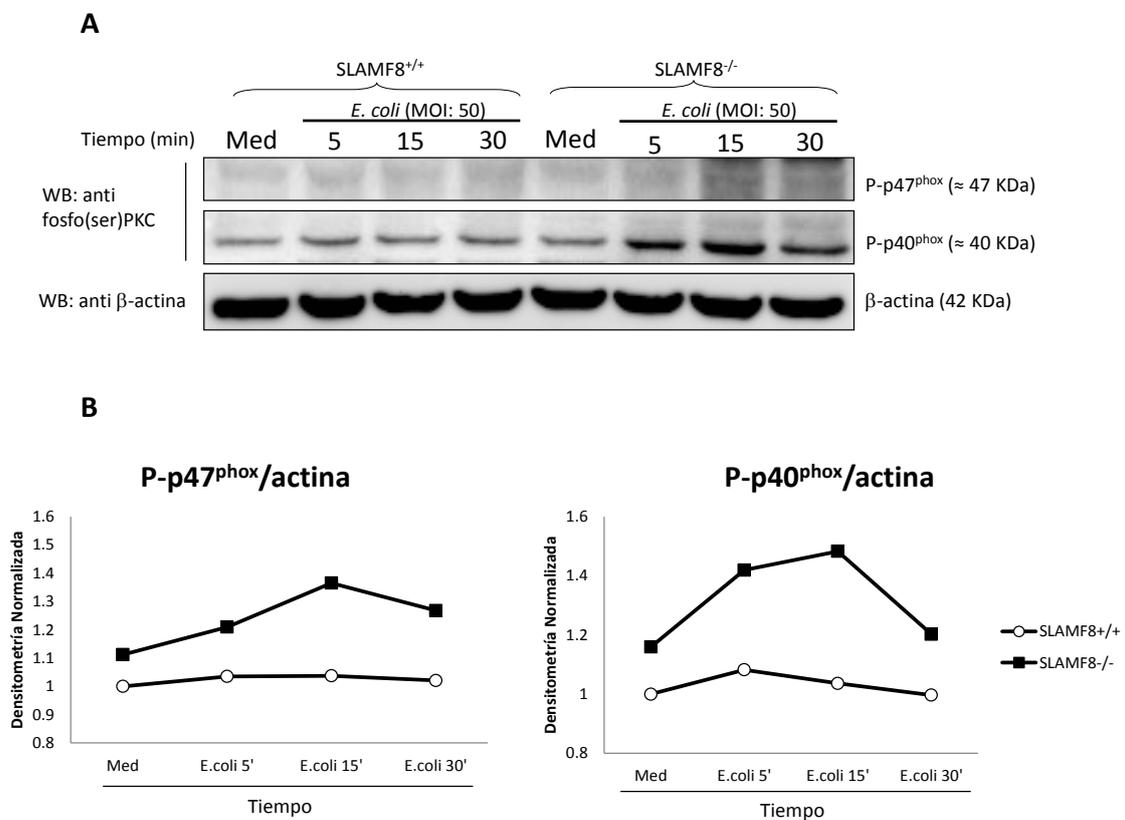


Figura 11 | Fosforilación de p47^{pho} y p40^{phox} por la PKC en macrófagos peritoneales de ratón obtenidos con TGC y estimulados *E. coli*. (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} y p40^{phox} fosforilados con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, sustratos de la PKC, en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y salvajes activados con *E. coli* a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. La deficiencia de SLAMF8 se asocia a una mayor fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} vía PKC con respecto a los MΦ salvajes tras la exposición con *E. coli*. El experimento mostrado es representativo de entre 7 experimentos realizados.

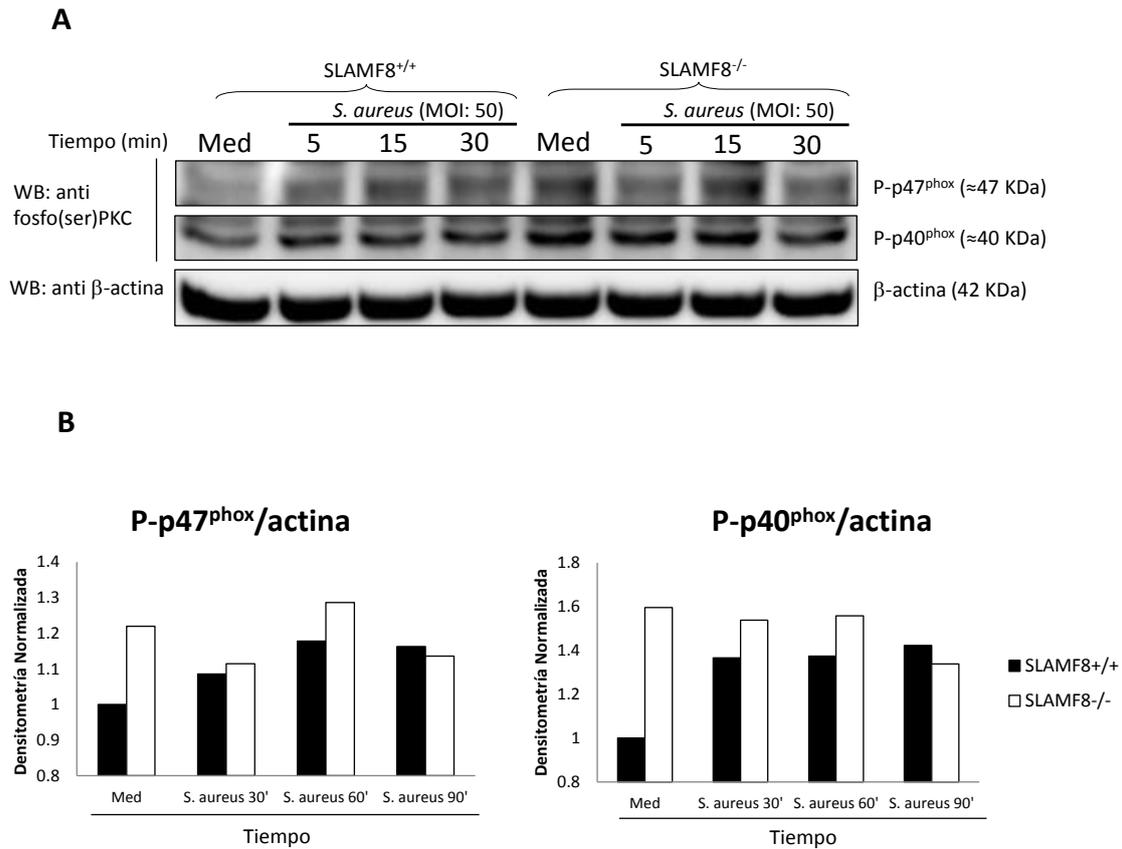


Figura 12 | Fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} por la PKC en macrófagos peritoneales de ratón obtenidos con TGC y estimulados *Staphylococcus aureus*. (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} y p40^{phox} fosforilados con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, sustratos de la PKC, en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y salvajes activados con *S. aureus* a diferentes tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Inmunoblot* por densitometría. Al igual que ocurre con bacteria Gram negativa, se observa una mayor fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} vía PKC en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} con respecto a los *SLAMF8*^{-/-} salvajes tras la exposición con *S. aureus*. Los datos mostrados son representativos de entre 7 experimentos independientes.

Distintos grupos, entre los que nos incluimos, hemos observado que la expresión de SLAMF8 aumenta en MΦ y Mo activados con distintos estímulos, tanto procedentes de lavado peritoneal con TGC como de médula ósea [1, 20]. Al igual que para MΦ con TGC, los MΦ derivados de médula ósea mostraron un incremento de la producción de O₂⁻ cuando procedían de ratones *SLAMF8*^{-/-} y en comparación con los salvajes [1]. Estudiamos por tanto la fosforilación de p40^{phox} y p47^{phox} en MΦ de ratón diferenciados *in vitro* a partir de células

madre procedentes de médula ósea y observamos que los resultados hallados en MΦ obtenidos con TGC son reproducibles, al menos cuando son tratados con PMA (Fig. 13).

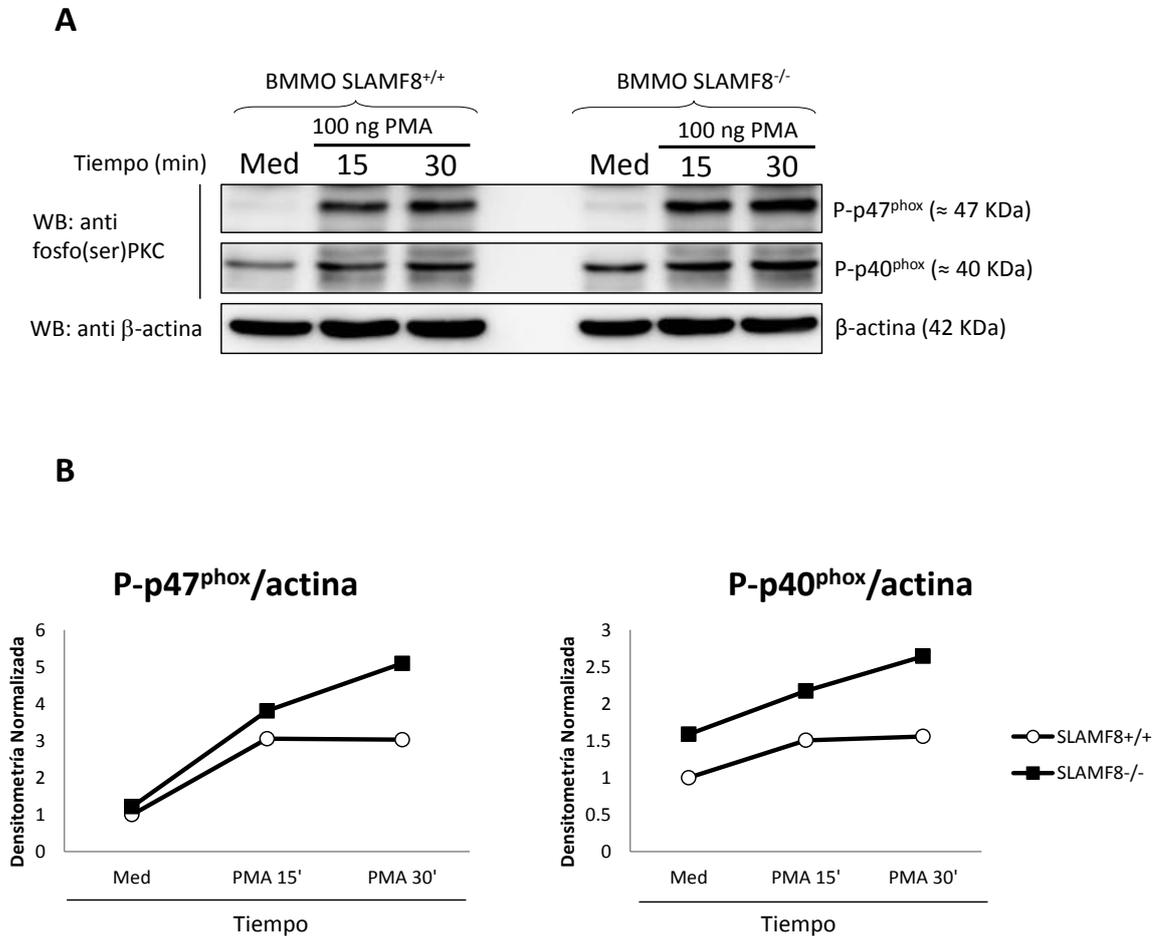


Figura 13 | Fosforilación de p47^{pho} y p40^{phox}, por la PKC en macrófagos de ratón derivados de médula ósea (BMMO) tratados PMA. (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} y p40^{phox} fosforilados con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, sustratos de la PKC, en BMMO *SLAMF8*^{-/-} y salvajes activados con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. Al igual que los MΦ peritoneales obtenidos con TGC, la ausencia de *SLAMF8* está relacionada con una mayor fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} vía PKC al compararse con los MΦ salvajes. Resultados representativos de 4 experimentos independientes.

6.2.- Estudio de la fosforilación de p40^{phox} en la activación de la NADPH oxidasa.

Con objeto de confirmar los datos obtenidos con el anticuerpo frente a la fosforilación en Ser por la PKC, quisimos estudiar la fosforilación de la subunidad p40^{phox} con un anticuerpo que reconoce específicamente a esta subunidad citosólica fosforilada en la Thr154 [144] y 3 nuevo. Los resultados obtenidos confirmaron lo observado hasta ahora; la subunidad p40^{phox} presenta mayor cantidad de la subunidad fosforilada en MΦ SLAMF8^{-/-} que en MΦ procedentes de ratones WT activados con PMA (Fig. 14). El análisis de la fosforilación de p40^{phox} con otros estímulos, tales como LPS puro (Fig. 15) o bacteria *E. coli* o *S. aureus* (Fig. 16 y 17), mostró un incremento en la fosforilación de esta subunidad comparada con los MΦ peritoneales WT. Aunque debemos destacar que la estimulación con LPS induce una menor fosforilación de p40^{phox}, esto parece que es debido a que cada estímulo activa distintas rutas de activación del complejo.

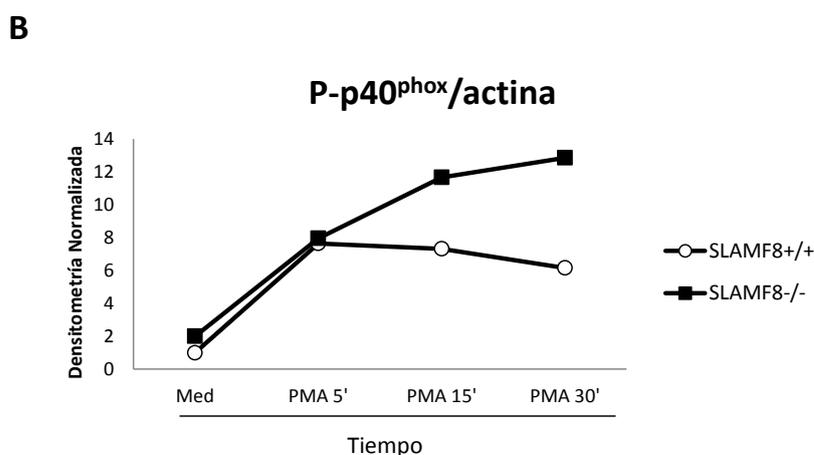
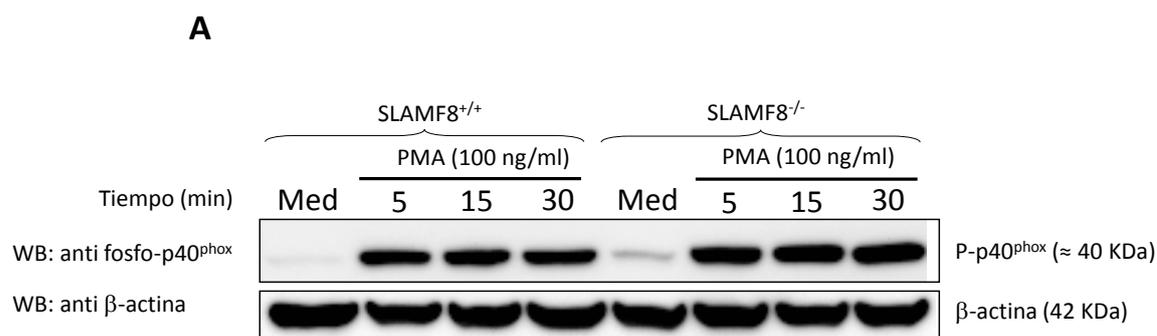


Figura 14 | Fosforilación de p40^{phox} (Thr154), subunidad citosólica de la NADPH oxidasa, en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con PMA. (A) Detección por *Western Blot* de p40^{phox} fosforilada en MΦ peritoneales SLAMF8^{-/-} y salvajes activados con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. Existe mayor fosforilación de p40^{phox} en MΦ peritoneales SLAMF8^{-/-} con respecto a los MΦ salvajes activados con PMA. Resultados representativos de 5 experimentos independientes.

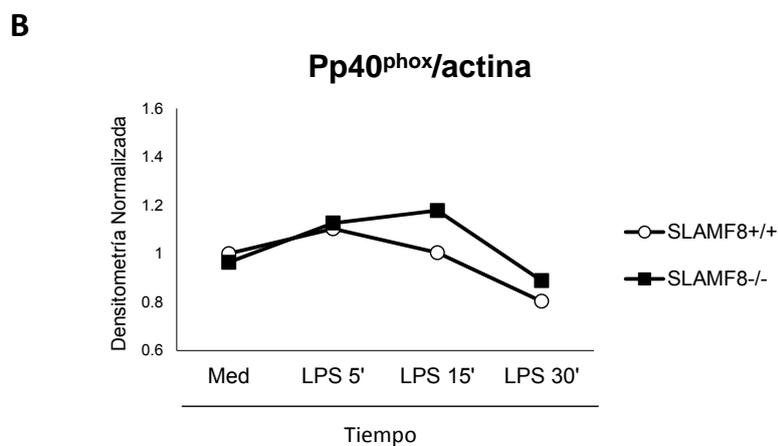


Figura 15 | Fosforilación p40^{phox} (Thr154), subunidad citosólica de la NADPH oxidasa, en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con LPS. (A) Detección por *Western Blot* de p40^{phox} fosforilada en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y salvajes activados con LPS puro a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. En ausencia de *SLAMF8*, se observa una mayor fosforilación de p40^{phox} al compararse con los MΦ salvajes tratados con LPS puro. Los resultados corresponden a un ensayo representativo de entre 4 experimentos independientes.

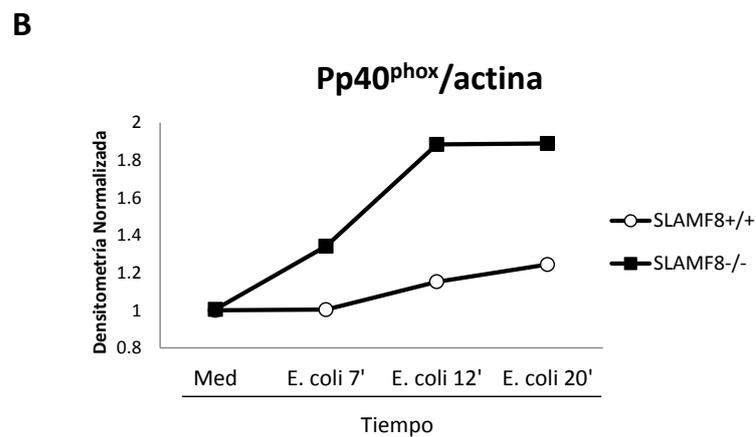
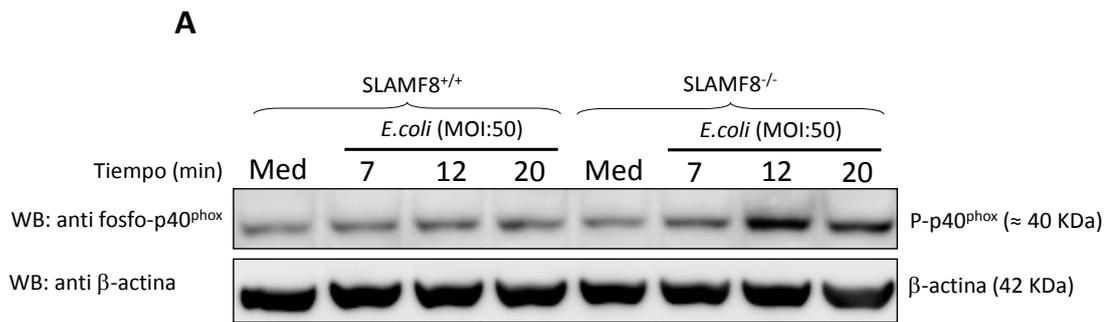


Figura 16 | **Fosforilación de p40^{phox} (Thr154), subunidad citosólica de laNADPH oxidasa, en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con bacteria.** (A) Detección por *Western Blot* de p40^{phox} fosforilada en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y salvajes activados con *E. coli* a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Inmunoblot* por densitometría. La subunidad p40^{phox} está más fosforilada en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} que en MΦ peritoneales salvajes tras la activación con *E. coli*. Datos representativos de entre 3 experimentos independientes.

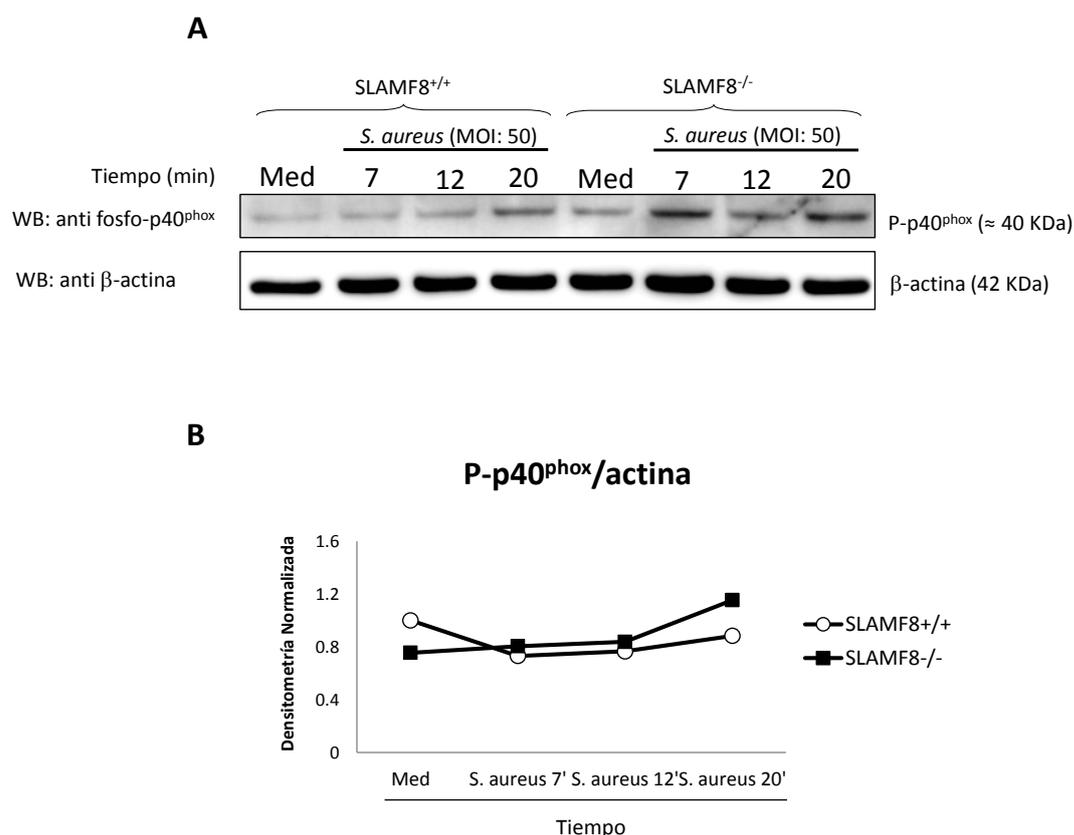


Figura 17 | Fosforilación de p40^{phox} (Thr154), subunidad citosólica de la NADPH oxidasa, en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con bacteria. (A) Detección por *Western Blot* de p40^{phox} fosforilada en MΦ peritoneales SLAMF8^{-/-} y salvajes activados con *S. aureus* a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. La subunidad p40^{phox} está más fosforilada en los MΦ peritoneales SLAMF8^{-/-} que en MΦ peritoneales salvajes tras la activación con *S. aureus*. Datos representativos de entre 3 experimentos independientes.

6.3.- Activación de la NADPH oxidasa en macrófagos de ratón peritoneales pretratados con IFNγ.

Uno de los estímulos más potentes en la inducción de la expresión de SLAMF8 se produce tras ser tratados los MΦ con IFNγ. Este incremento es significativo incluso a las 4 h del tratamiento con IFNγ [1]. Si SLAMF8 aumenta en los MΦ preincubados con IFNγ (Fig. 18), y esta molécula tiene un papel modulador negativo sobre el complejo NADPH oxidasa como hemos comprobado, cabe pensar que este efecto regulador se observe en MΦ salvajes

pretratados con IFN γ , descendiendo entonces la actividad de la NADPH oxidasa cuando son estimulados. Para confirmar esta hipótesis, M Φ peritoneales WT fueron preincubados con IFN γ y posteriormente fueron activados con distintos estímulos. Al analizar la fosforilación de la subunidad p47^{phox} se observó que efectivamente la fosforilación de p47^{phox} fue menor en los M Φ TGC de ratón pretratados con IFN γ y estimulados posteriormente con PMA (Fig. 19). Este resultado se repitió cuando los M Φ pretratados con IFN γ fueron posteriormente estimulados con bacteria, bien sea con *S. aureus* (Fig. 19) o *E. coli* (Fig. 20), mostrando un descenso en la actividad del complejo NADPH oxidasa.

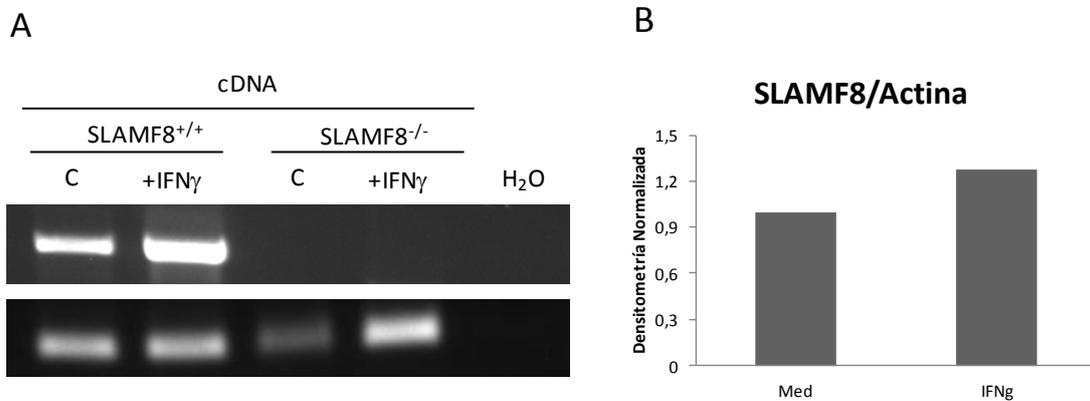


Figura 18 | **Expresión del mRNA de SLAMF8 por RT-PCR de macrófagos de ratón pretratados o no con IFN γ durante 24 horas.** SLAMF8 aumenta en M Φ peritoneales obtenidos con TGC preincubados con IFN γ . Se utilizó cDNA de M Φ *SLAMF8*^{-/-} como control negativo de la expresión de SLAMF8.

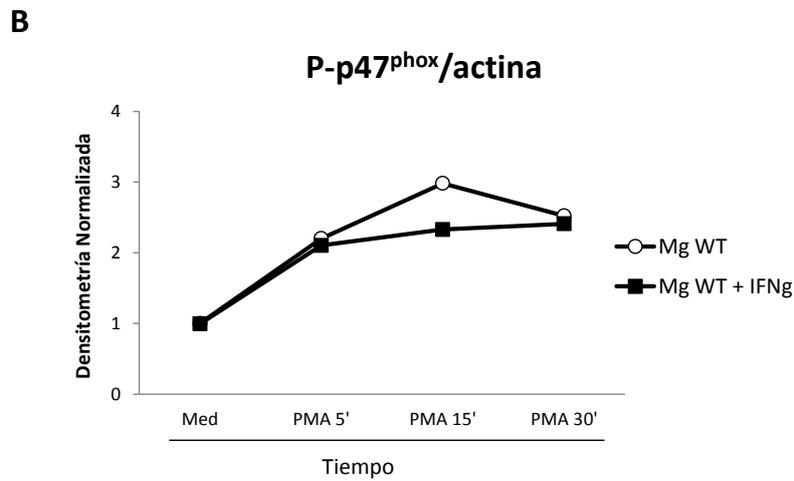
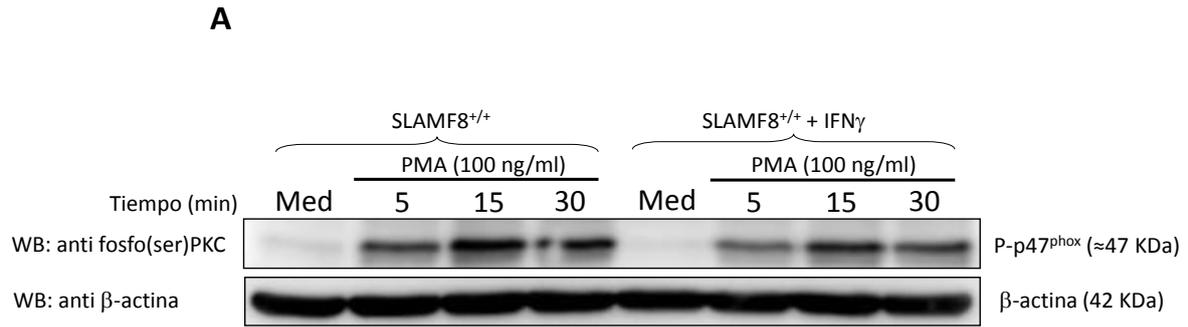


Figura 19 | **Fosforilación de p47^{phox} en macrófagos pretratados con IFN γ 24 h.** (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} fosforilado con anticuerpos frente a motivos fosfo(serina), sustratos de la PKC, en M Φ peritoneales obtenidos con TGC salvajes pretratados con IFN γ (24 h) activados con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. Los macrófagos salvajes pretratados con IFN γ y posteriormente estimulados con PMA muestran una menor fosforilación de p47^{phox}. Datos mostrados de un ensayo representativo de entre 3 realizados.

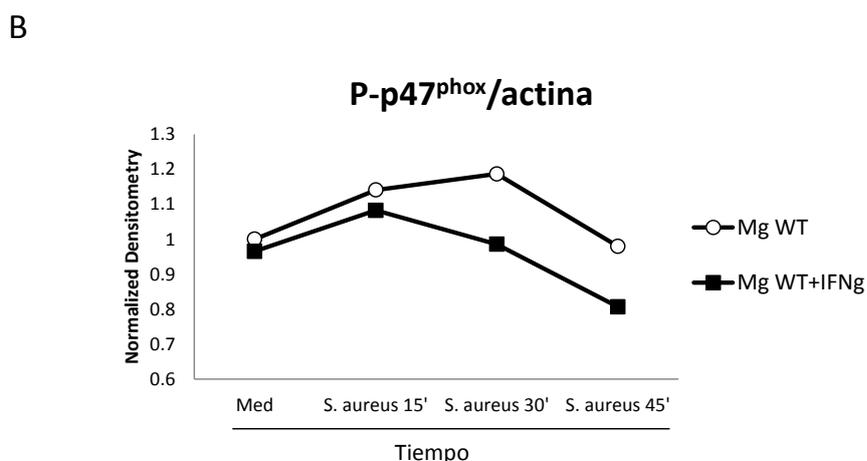
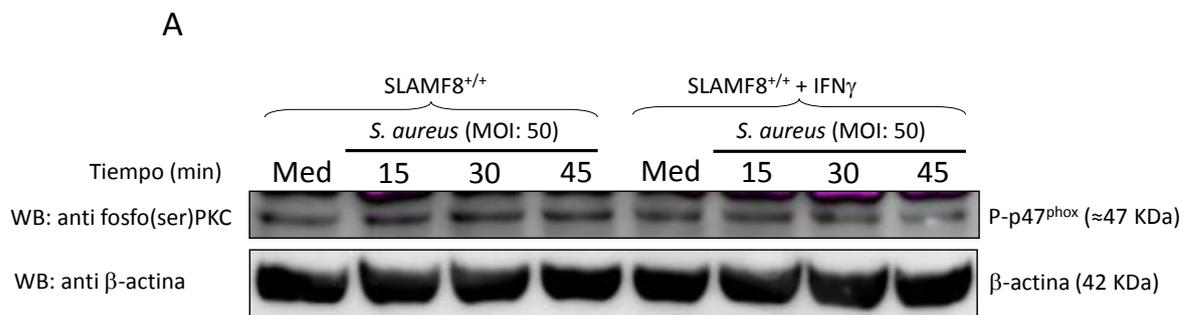


Figura 20 | Fosforilación de p47^{phox} en macrófagos pretratados con IFN γ 24 h. (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} fosforilado con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, sustratos de la PKC, en M Φ peritoneales obtenidos con TGC salvajes pretratados con IFN γ (24 h) activados con *S. aureus* distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblot* por densitometría. Existe menor cantidad de p47^{phox} fosforilado en los M Φ preincubados con IFN γ activados con *S. aureus* con respecto a los macrófagos que no fueron pretratados con IFN γ . Estos resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

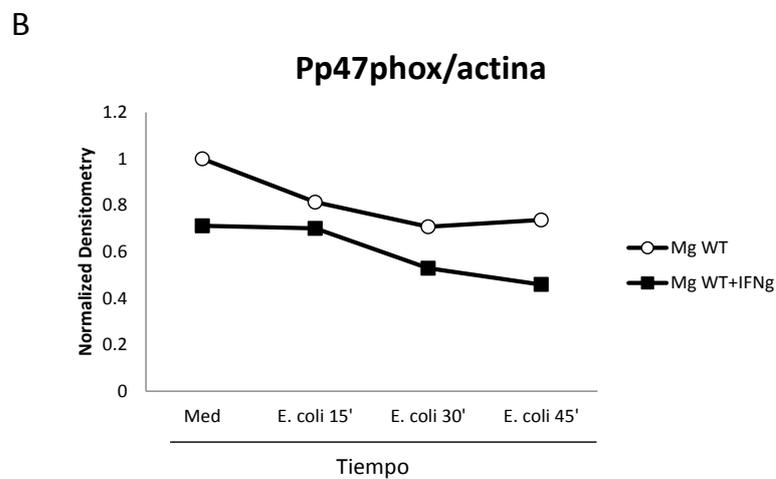
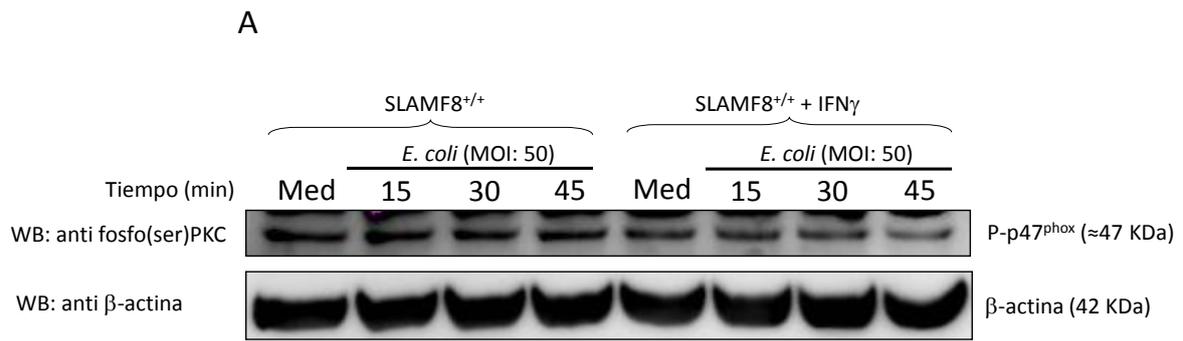


Figura 21 | **Fosforilación de p47^{phox} en macrófagos pretratados con IFN γ 24 h.** (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} fosforilado con anticuerpos frente a motivos fosfoserina, substratos de la PKC, en M Φ peritoneales obtenidos con TGC salvajes pretratados con IFN γ (24 h) activados con *E. coli* a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Inmunoblot* por densitometría. La fosforilación de p47^{phox} desciende en M Φ activados con *E. coli* preincubados con IFN γ al compararse con los M Φ no pretratados con IFN γ . Datos representativos de entre 3 experimentos independientes.

6.4.- Regulación de SLAMF8 sobre la Activación de p38 MAPK.

Numerosos estudios han demostrado la importancia de las MAPK en procesos tan relevantes para los fagocitos como son la producción de $O_2^{\bullet -}$ o fagocitosis [162, 192, 213, 214]. Se ha verificado que la activación de la NADPH oxidasa implica la vía de las MAPK, ERK y p38 MAPK, y aunque ha sido ampliamente demostrada esta participación no ha sido señalada como una de las vías más importantes. [15, 17, 19, 215]. Poner [14, 15 26-31].

Con objeto de determinar si la activación de las MAPK pudiera estar también modificada analizamos en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} la fosforilación de esta proteína p38 MAPK. mediante *Western Blot* Las células se estimularon con PMA, LPS y bacteria (*E. coli* y *S. aureus*) a distintos tiempos. El estudio de extractos totales de MΦ obtenidos con TGC demuestra que, en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} activados con PMA presentan una mayor cantidad de ésta en comparación con los MΦ procedentes de ratones WT (Fig. 22). Este resultado es de gran interés pues, si la estimulación con PMA indica una activación directa a través de la PKC saltándose la activación Src quinasas y PI3K [15, 162], se confirma la conexión entre la NADPH oxidasa y una posterior activación de p38 MAPK en condiciones normales, aunque ocurra por segundos mensajeros.

La participación de MAPK en el fenotipo de los *SLAMF8*^{-/-} se corroboró en ensayos de estimulación con *E. coli* o *S. aureus* (Fig. 23 y 24). Estos resultados nos permiten demostrar por otra parte, que la activación de la NADPH oxidasa por la vía de las MAPK tiene también un papel importante y contribuye a la correcta activación del enzima frente a distintos estímulos [9]. Hay que destacar el incremento de fosforilación de la quinasa p38 MAPK cuando los MΦ son estimulados con LPS (Fig. 25), que como hemos visto en el apartado 6.2 de esta sección (Fig. 15) induce menos fosforilación de la subunidad p40^{phox} (p47^{phox} no se detectó) por no inducir estimulación directa a través de la PI3K o PKC [213, 214, 216, 217]. Todo esto indica que p38 MAPK está sobre activada en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} tanto cuando se estimula directamente sobre PKC, o cuando participan otros receptores. Se ha sido descrito que la NADPH oxidasa puede ser activada a través de distintos receptores, factores de crecimiento, citoquinas, TLR, etc., aunque las vías de activación no están bien dilucidadas. Estos resultados resaltan la posibilidad de que en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} haya otros procesos modificados en los que esté implicada p38 MAPK, y que estén o no relacionados con la activación directa de NADPH oxidasa [206].

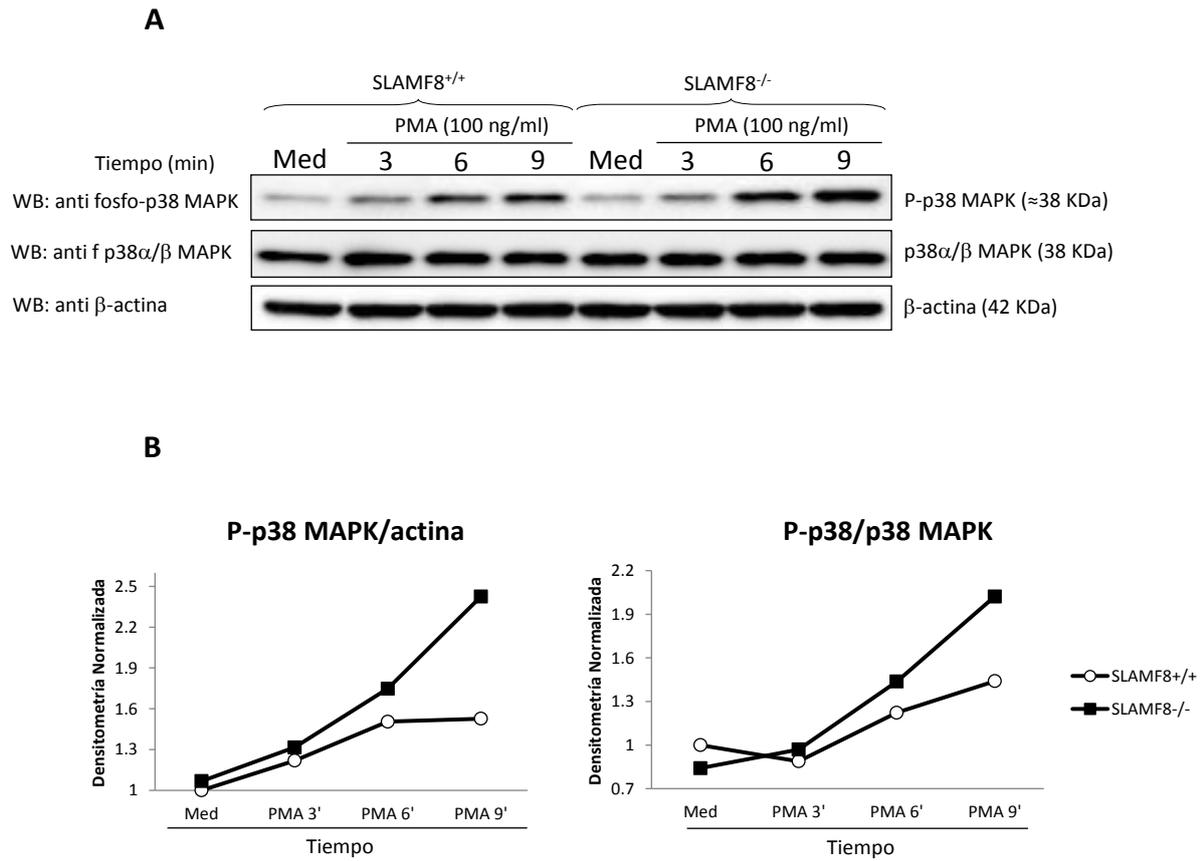


Figura 22 | **Fosforilación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con PMA.** (A) Detección por *Western Blot* de p38 MAPK fosforilado en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT activados con PMA a diferentes tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. La deficiencia de *SLAMF8* está relacionada con una mayor fosforilación de p38 MAPK con respecto a los MΦ WT tras una estimulación con PMA. Se muestra un ensayo representativo de entre 5 experimentos independientes.

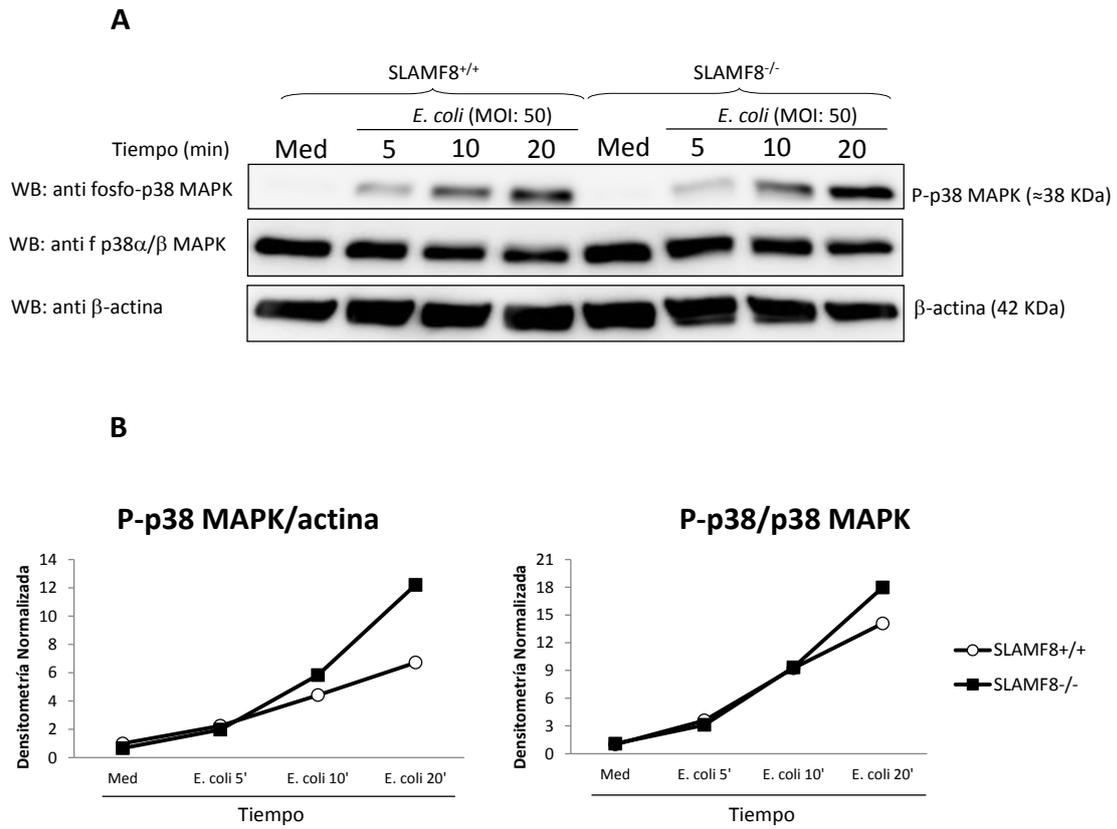


Figura 23 | Fosforilación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con *E. coli*. (A) Detección por *Western Blot* de p38 MAPK fosforilado en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT activados con *E. coli* a diferentes tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. En ausencia de *SLAMF8* los MΦ peritoneales incubados con *E. coli* muestran más p38 MAPK fosforilado respecto a los MΦ WT. Los datos mostrados son representativos de entre 3 experimentos independientes.

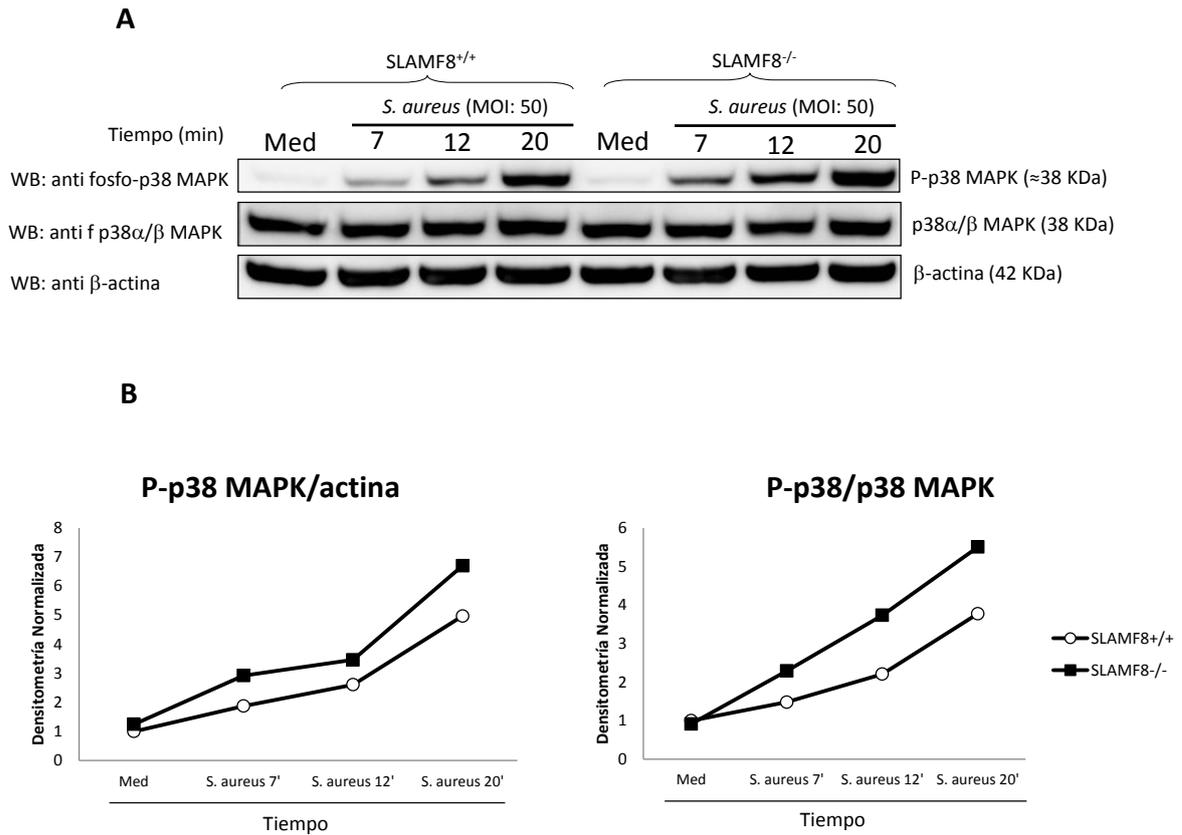


Figura 24 | Fosforilación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con *S. aureus*. (A) Detección por *Western Blot* de p38 MAPK fosforilado en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT activados con *S. aureus* a diferentes tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. Al igual que ocurre con los estímulos anteriores, la deficiencia de *SLAMF8* está asociada a una mayor fosforilación de p38 MAPK en comparación con los MΦ WT. Resultados representativos de entre 3 experimentos independientes.

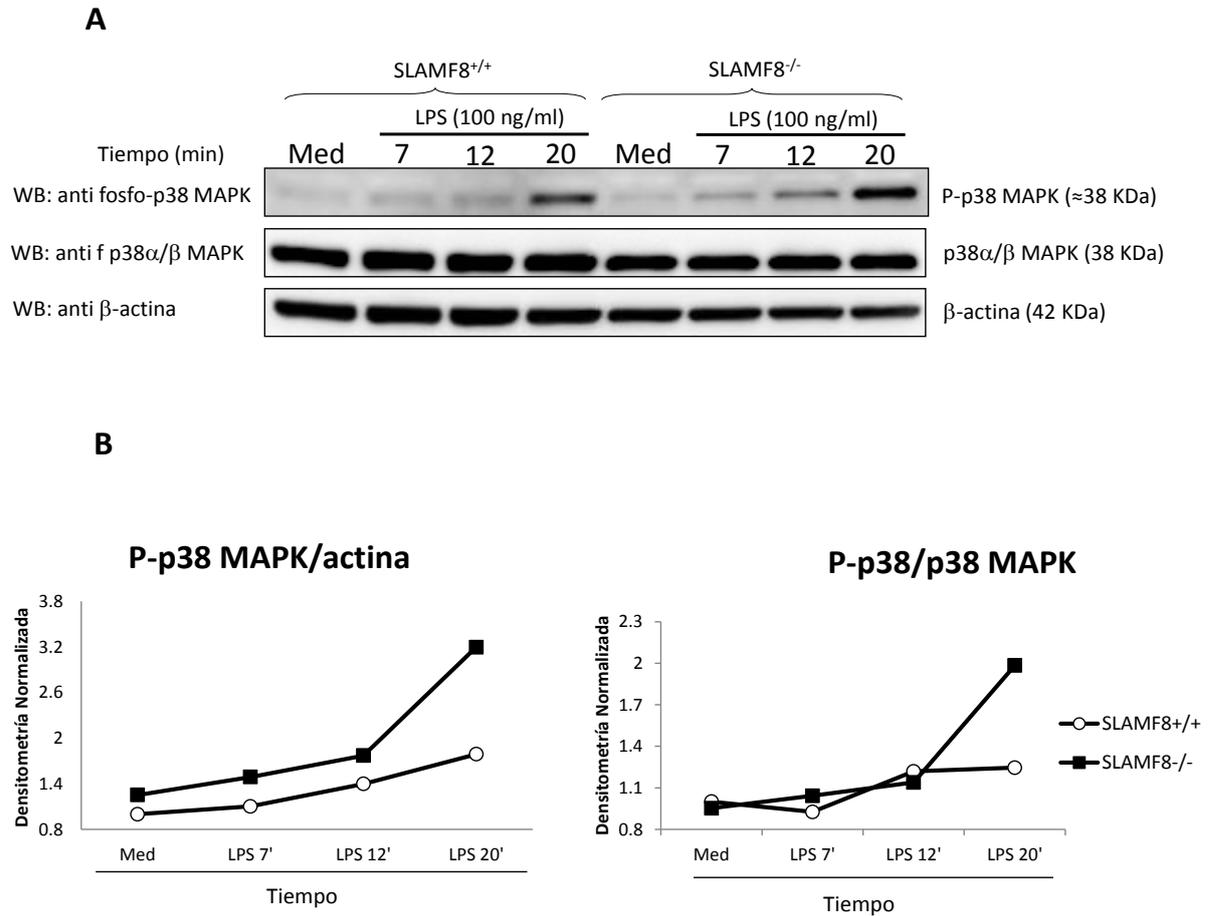


Figura 25 | **Fosforilación de p38 MAPK en macrófagos peritoneales obtenidos con TGC estimulados con LPS puro.** (A) Detección por *Western Blot* de p38 MAPK fosforilado en MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT activados con LPS puro a diferentes tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. Se observa una mayor fosforilación de p38 MAPK en los MΦ peritoneales deficientes en *SLAMF8* activados con LPS puro al compararse con los MΦ WT. Se muestra un ensayo representativo de entre 3 experimentos independientes.

6.5.- Reclutamiento de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox} de la NADPH oxidasa por Inmunofluorescencia.

Sabemos que en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} presentan una mayor fosforilación de al menos las subunidades p47^{phox} y p40^{phox}. La activación de la NADPH oxidasa requiere, junto a la fosforilación de los componentes del enzima, el acoplamiento de los mismos a la membrana de vesículas que posteriormente se acoplan al fagosoma (Fig. 26). Parece ser que para la activación de la NADPH oxidasa es necesario primero que la subunidad p47^{phox} citosólica se asocie a p22^{phox}, estabilizando el complejo para posteriormente activar su función oxidativa

[4]. La fusión de vesículas contribuye a una activación más efectiva y por tanto mayor producción de superóxido [218].

Teniendo en cuenta todo esto, es lógico pensar que el estudio comparativo mediante microscopia confocal de las subunidades citosólicas y de membrana, p47^{phox} y p22^{phox}, en los MΦ de ratones *SLAMF8*^{-/-} y WT, mostraría diferencias en la intensidad de fluorescencia proporcionales a la formación del complejo y actividad de la NADPH oxidasa. La intensidad de fluorescencia de p47^{phox} se corresponderá con el reclutamiento de esta subunidad citosólica a la membrana en la vesícula, y en la subunidad p22^{phox} con la fusión de vesículas. Para llevar a cabo este objetivo utilizamos MΦ obtenidos de peritoneo previa inyección de TGC y activados con PMA a distintos tiempos. Este estudio reveló que en los MΦ de ratones *SLAMF8*^{-/-} efectivamente presentan un reclutamiento mayor de la subunidad p47^{phox} que en los MΦ de ratones consanguíneos BALB/c a los 5 min. de tratamiento (Fig. 27) No se observaron diferencias en el estudio de p47^{phox} a los 15 min. de tratamiento (Fig. 28). Respecto a la subunidad p22^{phox} observamos unos valores relativos de fluorescencia significativamente superiores a los 5 y 15 min. en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} (Fig. 29 y 30). Este hecho puede que se deba a que la fusión de microvesículas portadoras de p22^{phox} estaría incrementada en MΦ *SLAMF8*^{-/-} en comparación con los MΦ BALB/c WT. Los valores relativos de intensidad de fluorescencia eran superiores de manera significativa en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} para p47^{phox} y p22^{phox} (Fig. 27-30).

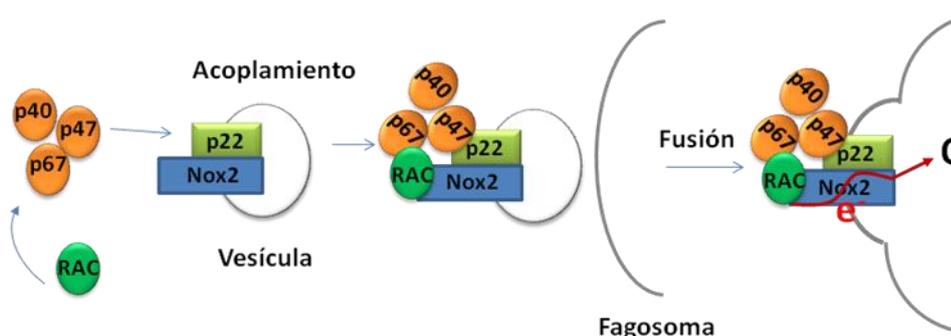


Figura 26 | **Acoplamiento de las subunidades de la NADPH oxidasa y activación.** Tras la activación del fagocito se produce la fosforilación de las subunidades del complejo NADPH oxidasa y su correspondiente ensamblaje de las subunidades citosólicas (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y RAC) con las de membrana (gp91^{phox} y p22^{phox}) localizadas principalmente en la membrana de vesículas. Estas vesículas se fusionarán más tarde con los fagosomas donde se llevará a cabo la producción de ROS.

En este análisis sorprende, en principio, el hecho de que en el comportamiento entre ambas subunidades haya un desfase. Esto puede deberse a que la cinética de reclutamiento de la subunidad citosólica p47^{phox} sea anterior a la activación completa del enzima y fusión de vesículas. Por tanto, en los ratones *SLAMF8*^{-/-} puede estar incrementada tanto la activación como la fusión de vesículas. Es por esto que p22^{phox} presenta una diferencia de fluorescencia en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} a tiempos más tardíos que en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} [12-14]. Es probable que en estudios a tiempos más largos, los valores de intensidad de fluorescencia para la subunidad p22^{phox} se vean igualados como ocurre con p47^{phox} a los 15 min, y que este fenómeno se deba a diferencias en la cinética de formación de vesículas entre los MΦ *SLAMF8*^{-/-} y los WT. Podemos, por tanto, sospechar que no solo hay una mayor actividad enzimática en la producción de ROS, sino que *SLAMF8* puede estar implicado en otras funciones relacionadas con la fusión de vesículas. Este hecho está siendo actualmente objeto de estudio en nuestro grupo en profundidad.

En el apartado anterior hemos comprobado que la actividad enzimática de la NADPH oxidasa es también superior en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} cuando eran incubados con bacteria GRAM negativa *E. coli* (F18). Realizamos el mismo experimento tratando los MΦ con bacteria *E. coli* transfectada con un plásmido que sobre-expresa la molécula GFP (ver materiales y métodos). Las subunidades de la NADPH oxidasa fueron marcadas con anticuerpos en color rojo (TRIFC). Aunque este estudio necesita ser ampliado, como se observa en las fotografías, efectivamente en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} encontramos mayor número de puntos de colocalización verde/rojo, en amarillo, que en los ratones WT, indicando que la activación de la NADPH oxidasa en los ratones *SLAMF8*^{-/-} está acelerada o incrementada (Fig 31).

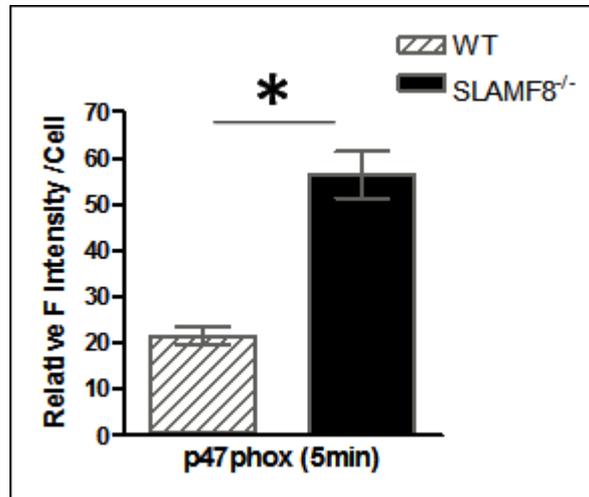
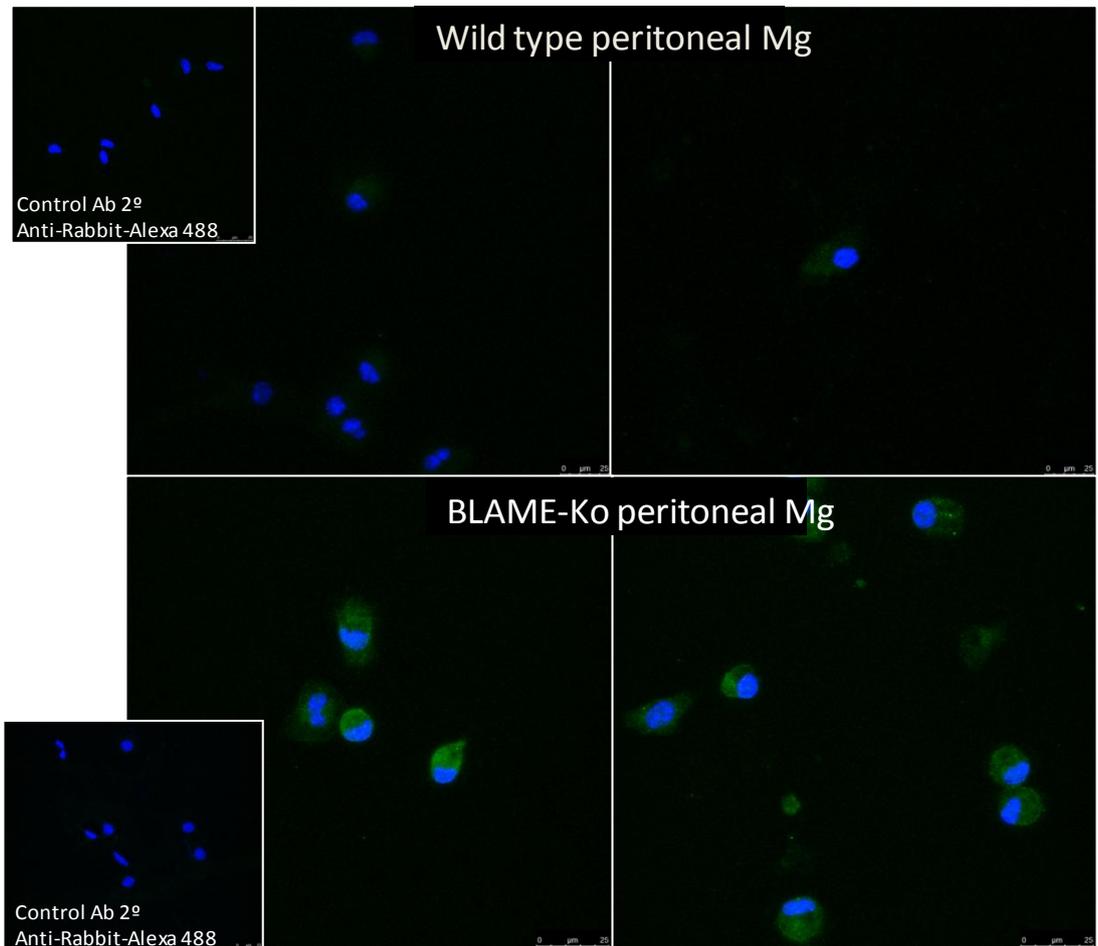


Figura 27 | Reclutamiento de p47^{phox} en los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} después de 5 minutos de activación. Inmunofluorescencia Confocal de MΦ peritoneales obtenidos con TGC, activados con PMA (100 ng/ml) durante 5 min. y marcados con Anti p47^{phox} (H-195). (A) Inmunofluorescencia Confocal de MΦ procedentes de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y WT consanguíneos marcados con p47^{phox} (63X). (B) Histograma del análisis cuantitativo de la intensidad relativa de fluorescencia de p47^{phox} en el tiempo indicado (mediana y desviación estandar de células en un campo de visión elegido al azar). Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado entre 3 ensayos independientes. *p<0.05; N=50.

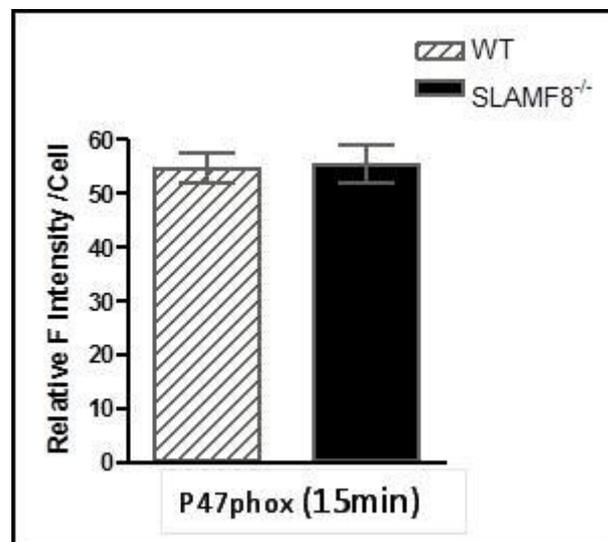
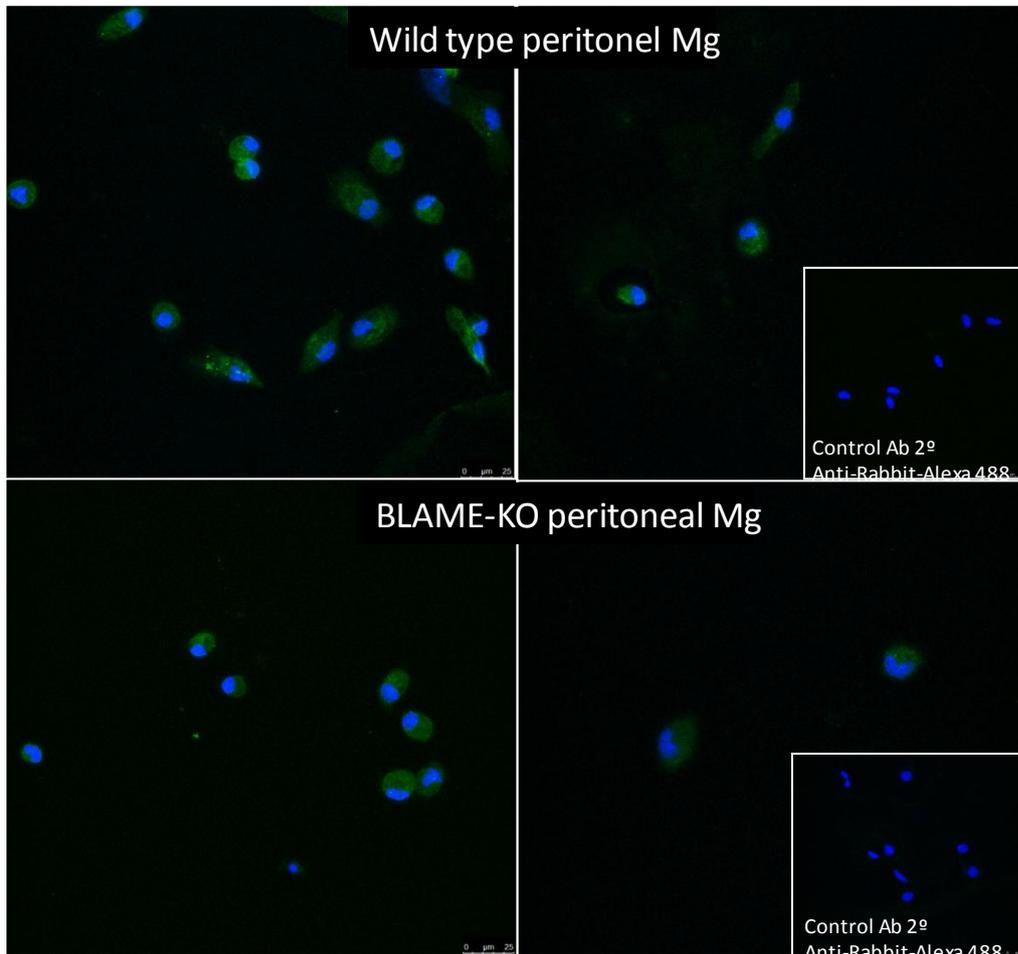


Figura 28 | **Reclutamiento de p47^{phox} en los macrófagos SLAMF8^{-/-} después de 15 minutos de activación.** Inmunofluorescencia Confocal de MΦ peritoneales obtenidos con TGC, activados con PMA (100 ng/ml) durante 15 min. y marcados con Anti p47^{phox} (H-195). (A) Inmunofluorescencia Confocal de MΦ procedentes de ratones BALB/c SLAMF8^{-/-} y WT consanguíneos marcados con p47^{phox} (63X). (B) Histograma del análisis cuantitativo de la intensidad relativa de fluorescencia de p47^{phox} en el tiempo indicado (mediana y desviación estandar de células en un campo de visión elegido al azar). Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado entre 3 ensayos independientes. N=50.

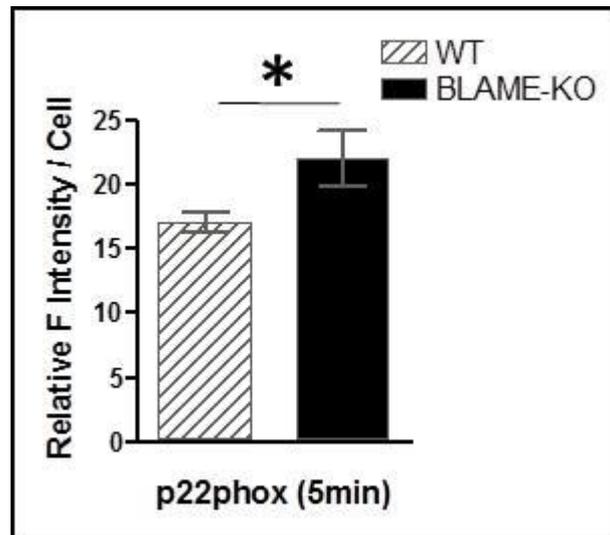
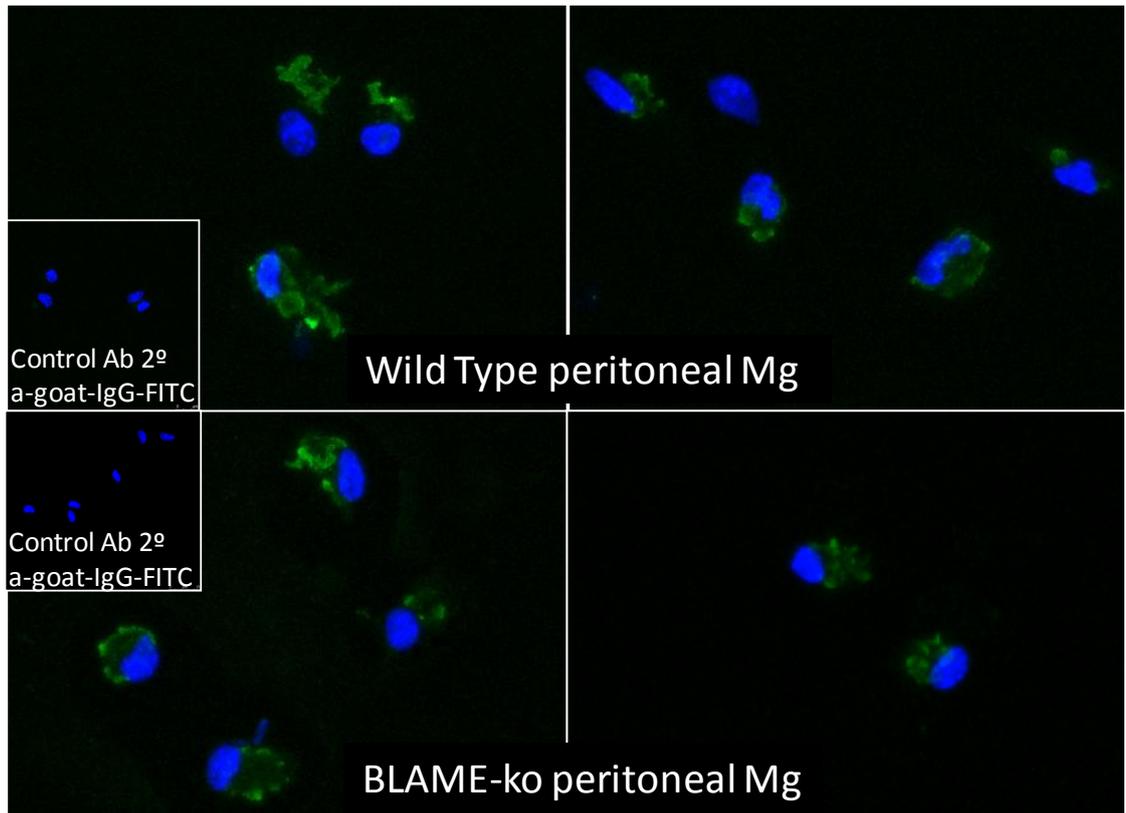


Figura 29 | **Reclutamiento de p22^{phox} en los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} después de 5 minutos de activación.** Inmunofluorescencia Confocal de MΦ peritoneales obtenidos con TGC, activados con PMA (100 ng/ml) durante 5 min. y marcados con Anti p22^{phox} (C-17). (A) Inmunofluorescencia Confocal de MΦ procedentes de ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} y WT consanguíneos marcados con p22^{phox} (63X). (B) Histograma del análisis cuantitativo de la intensidad relativa de fluorescencia de p22^{phox} en el tiempo indicado (mediana y desviación estandar de células en un campo de visión elegido al azar). Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado entre 3 ensayos independientes. *p<0.05; N=50.

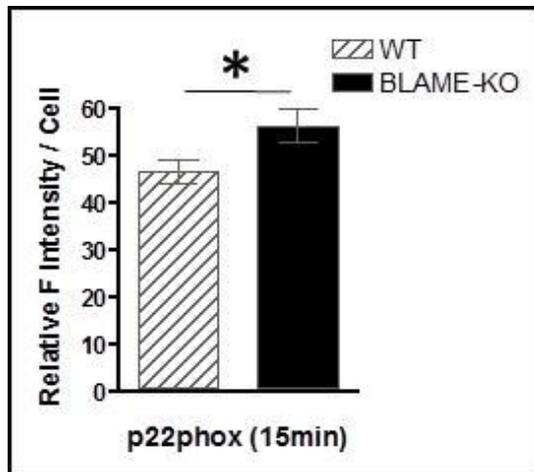
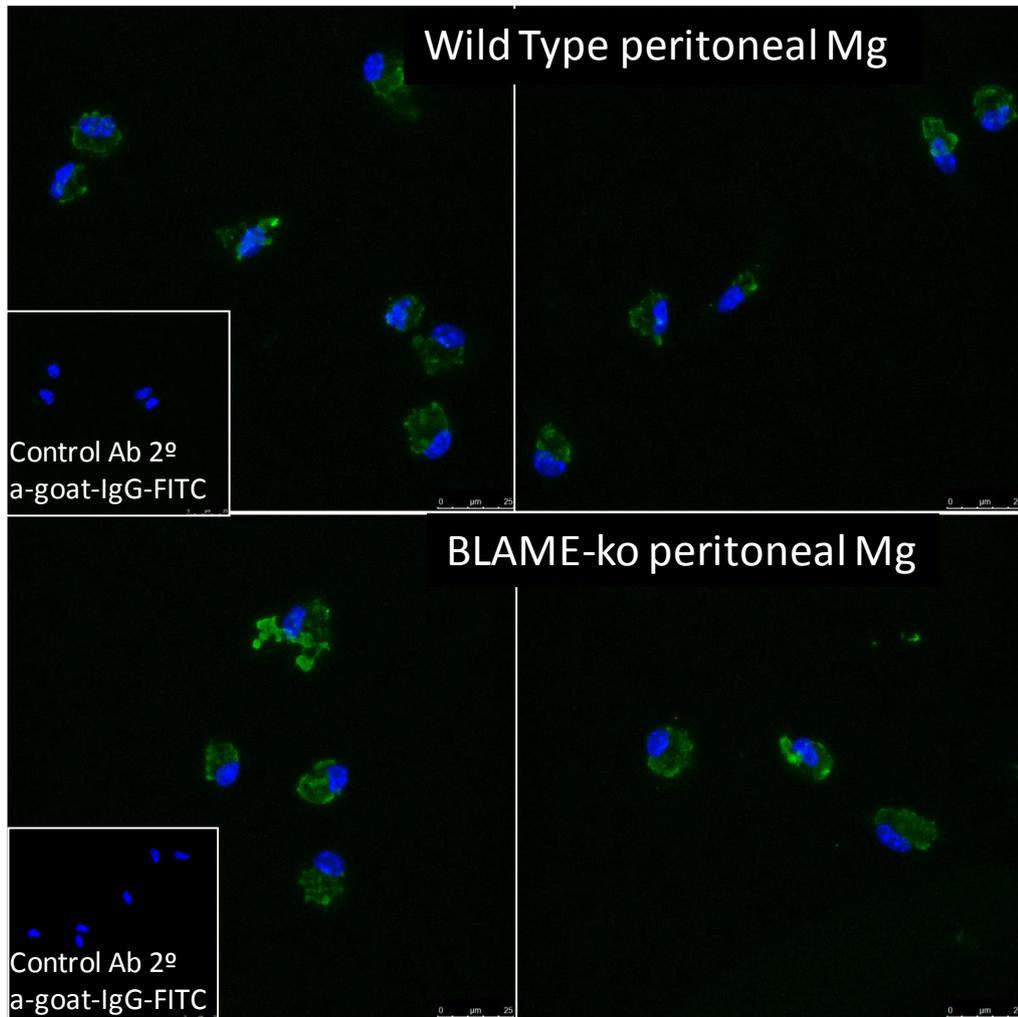


Figura 30 | Reclutamiento de $p22^{phox}$ en los macrófagos $SLAMF8^{-/-}$ después de 15 minutos de activación. Inmunofluorescencia Confocal de M Φ peritoneales obtenidos con TGC, activados con PMA (100 ng/ml) durante 15 min. y marcados con Anti $p22^{phox}$ (C-17). (A) Inmunofluorescencia Confocal de M Φ procedentes de ratones BALB/c $SLAMF8^{-/-}$ y WT consanguíneos marcados con $p22^{phox}$ (63X). (B) Histograma del análisis cuantitativo de la intensidad relativa de fluorescencia de $p22^{phox}$ en el tiempo indicado (mediana y desviación estandar de células en un campo de visión elegido al azar). Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado entre 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$; N=50.

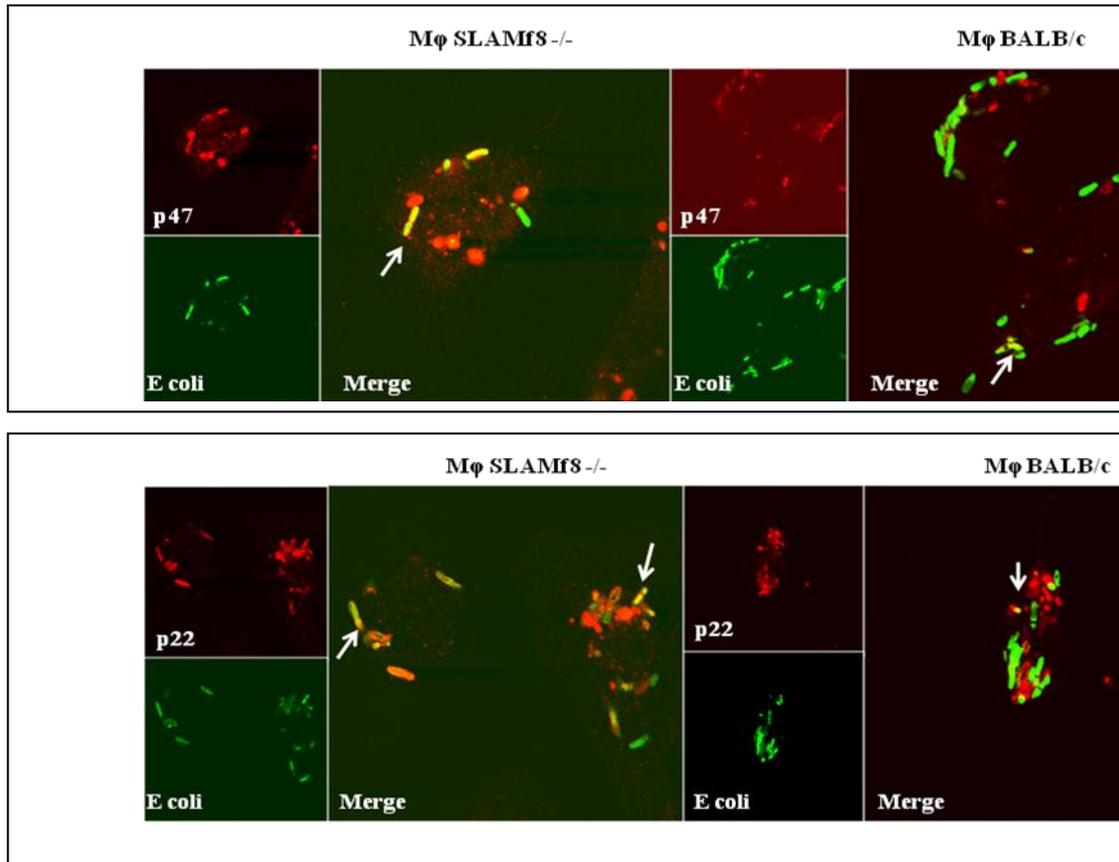


Figura 31 | Colocalización de bacteria *E. coli* (verde) con p47^{phox} (rojo) o p22^{phox} (rojo) en macrófagos *SLAMF8*^{-/-} que en Mg BALB/c. Estudio por Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal. (A) Fotografía de Microscopía Confocal de MΦ *SLAMF8*^{-/-} y WT incubados con *E. coli* (GFP) durante 15 min. y marcados con anti p47^{phox} + anti IgG-PE. (B) Fotografía de Microscopía Confocal de MΦ *SLAMF8*^{-/-} y WT incubados con *E. coli* (GFP) durante 15 min. y marcados con anti p22^{phox} + anti IgG-PE. (Aumentos 63X).

6.6.- Activación de p47^{phox} y p38 MAPK en monocitos humanos.

Hasta ahora hemos visto que SLAMF8 regula negativamente la estimulación de la NADPH oxidasa. El porcentaje de similitud de SLAMF8 humano y de ratón es de un 75 %, lo que hace sospechar que ambas moléculas no difieran mucho en su funcionalidad entre ambas especies. De hecho, según lo descrito por otros autores y confirmado por nuestro grupo, la expresión e inducción de SLAMF8 es similar en ambas [20, 204] (Fig. 32 y 33).

Nos propusimos, por tanto, demostrar que SLAMF8 está implicado en la activación de la NADPH oxidasa en MΦ humanos. Con este objetivo decidimos analizar la activación de la NADPH oxidasa con PMA en Mo humanos de sangre periférica incubados previamente o no con IFN γ . Como ya hemos , la estimulación de los Mo humanos con IFN γ incrementa la expresión de mRNA de SLAMF8. En la figura 32, se observa que los MΦ utilizados en este experimento incrementan el mensajero de SLAMF8, así como la expresión de la proteína (Fig. 32), después de ser incubados con IFN γ . En este caso, observamos, al igual que sucedía en MΦ peritoneales de ratón, que un incremento en la expresión de SLAMF8 en los MΦ induce una menor fosforilación de la subunidad citosólica p47^{phox}, confirmando una vez más el papel regulador SLAMF8 en MΦ (Fig. 33). Es importante destacar que, según Jutras y col.,[219], el tratamietno con IFN γ incrementa la asociación de proteínas en el fagosoma, modificando el proteinograma de éste en procesos de fagocitosis: Sería interesante ver si en los ratones SLAMF8^{-/-} hay modificaciones en este aspecto respecto a los MΦ WT.

En nuestros resultados no se hace separación de membrana y citosol, pero resultó relevante que se observará una menor fosforilación de p47^{phox} asociada al incremento de SLAMF8 en los Mo humanos incubados con IFN γ y activados con PMA. No obstante habría que corroborarlo aislando fagosomas o bien analizando extractos de membrana y citoplasmáticos.

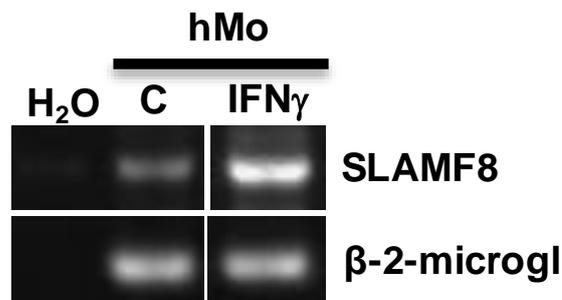


Figura 32 | **Expresión del mRNA de SLAMF8 por RT-PCR en monocitos humanos de sangre periférica tratados o no con IFN γ durante 24 horas.** SLAMF8 se incrementa en los Mo humanos preincubados con IFN γ .

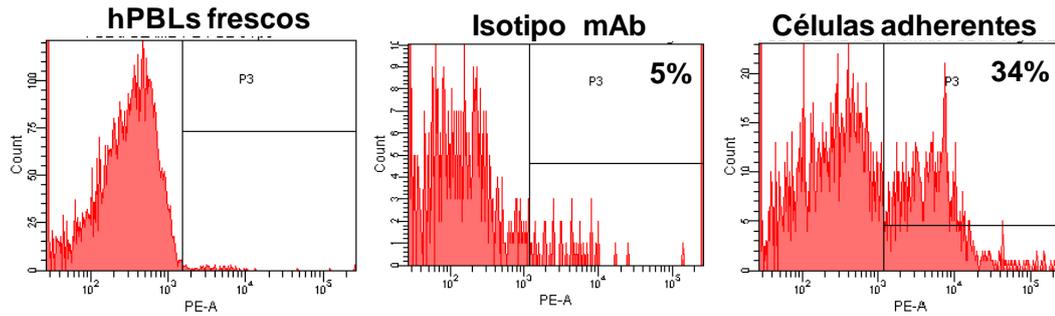
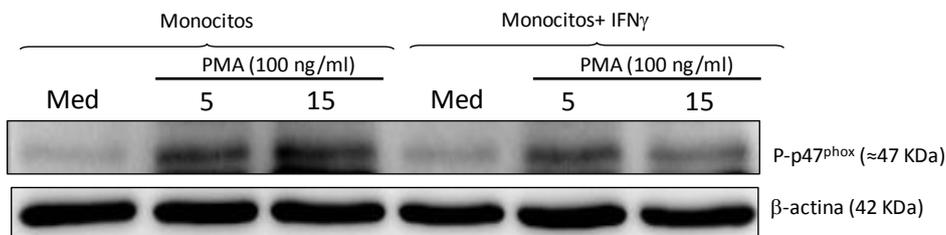


Figura 33 | **Expresión de SLAMF8 por FACS en monocitos humanos de sangre periférica tratados con IFN γ durante 24 horas.** SLAMF8 se incrementa en Mo humanos preincubados con IFN γ .

A



B

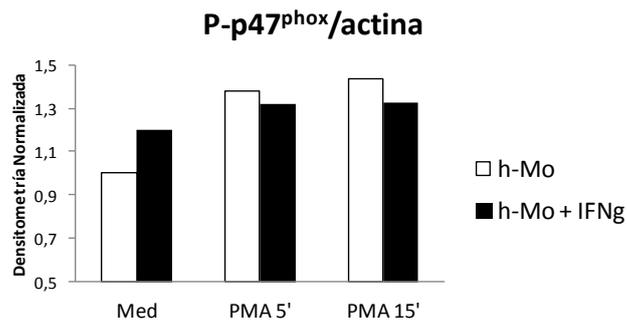


Figura 34 | **Fosforilación de p47^{phox} en monocitos humanos de sangre periférica pretratados con IFN γ .** (A) Detección por *Western Blot* de p47^{phox} fosforilado con anticuerpos frente a motivos fososerina, sustratos de la PKC, en Mo humanos pretratados con IFN γ (24h) activados con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Inmunoblot* por densitometría. La fosforilación de p47^{phox} disminuye al pretratar los Mo humanos de sangre periférica con IFN γ y posteriormente activar con PMA. Datos representativos de 3 experimentos independientes.

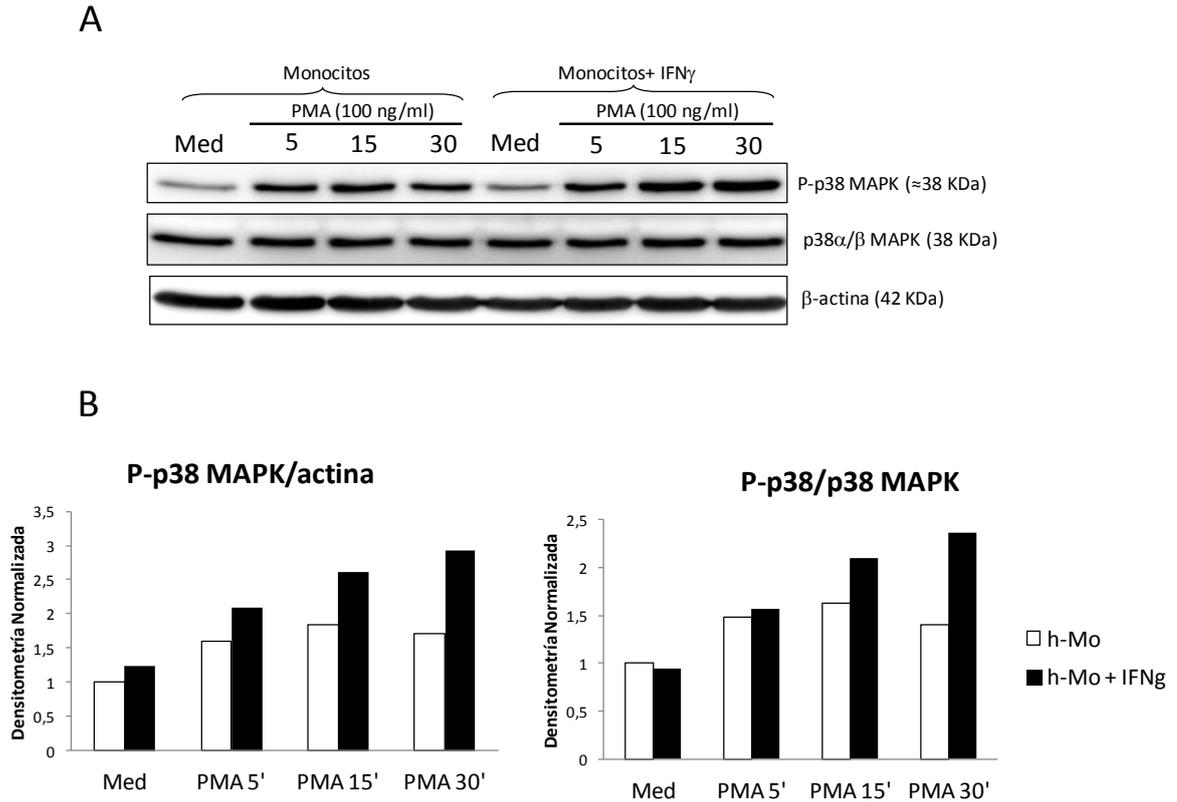


Figura 35 | **Fosforilación de p38 MAPK en monocitos humanos de sangre periférica pretratados con IFN γ y activados con PMA.** (A) Detección por *Western Blot* de p38 MAPK fosforilado en Mo humanos pretratados con IFN γ (24h) y activados posteriormente con PMA a distintos tiempos. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. Los monocitos de sangre periférica activados con PMA presentan mayor fosforilación de p38 MAPK al pretratar con IFN γ . Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Posteriormente, quisimos examinar la actividad de la quinasa p38 MAPK en Mo humanos tratados con IFN γ (Fig. 35), pudimos comprobar que los Mo humanos de sangre periférica activados con PMA, previamente tratados con IFN γ , muestran una mayor fosforilación de la p38 MAPK respecto a los Mo sin tratar con IFN γ . El incremento en la activación de MAPK en Mo tratados con IFN γ nos resulta normal ya que p38 MAPK participaría en la activación de estos y otros procesos independientes, relacionados o no con la NADPH oxidasa y SLAMF8. A falta de SLAMF8 se observa la disminución de activación de p38 MAPK, pero el efecto contrario puede que no sea detectable bajo un estímulo tan potente como la acción de IFN γ sumada a la estimulación con PMA en macrófagos WT.

6.7.- Translocación de RAC a la membrana en macrófagos.

RAC1/2 se describen como 2 nuevos componentes citosólicos del complejo NADPH oxidasa, pertenecen a la familia Rho-GTPasas junto a RAC3, Rho A y Cdc42. Diversos estudios previos han demostrado que este grupo de proteínas juegan un papel importante en múltiples procesos celulares tales como, la polimerización de actina, reorganización del citoesqueleto, regulación de la transcripción de genes, supervivencia celular, etc. La subfamilia RAC está constituida por tres proteínas, RAC1, RAC2 y RAC3 las cuales tienen alta homología [220]. La participación de GTPasas RAC en la activación de la NADPH oxidasa es fundamental, ya que se une a p67^{phox} activando el transporte de electrones y la formación final de O₂^{•-} [221]. En monocitos humanos, RAC1 es la GTPasa que forma parte del complejo NADPH oxidasa mientras que en neutrófilos predomina RAC2 [195, 222]. Por otro lado, se ha descrito que en ratones deficientes en RAC2, los MΦ tienen mermada la actividad de la NADPH oxidasa, mientras que RAC1 será esencial en otras funciones [223-225]. Las GTPasas en general se encuentran en el citoplasma formando un complejo con la proteína inhibidora GDI (*GDP, dissociation inhibitor*), de modo que cuando la célula es activada se separa de su inhibidor para trasladarse a la membrana y formar parte de otros complejos y, en el caso que nos ocupa, del complejo NADPH oxidasa a través de la subunidad p67^{phox} [195, 221, 226-228] (Fig. 24). Dado que, alteraciones de RAC en ratones [224] dan como resultado una menor actividad de la NADPH oxidasa, estudiamos si existía una desregulación del complejo además de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox}, ya que ésta es activada de manera paralela e independiente al resto de las subunidades [189, 223, 225]. Siguiendo el protocolo utilizado anteriormente, utilizamos MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y BALB/c WT, activados con PMA a distintos tiempos y analizamos la movilización de RAC en extractos citosólicos y de membrana.

En los resultados obtenidos, observamos que la movilización de RAC hacia la membrana es superior en ausencia de *SLAMF8* que en los MΦ procedentes de ratones WT (Fig. 36 y 37). Tal y como se observa en el *Western Blot* y en el histograma de densitometría, RAC disminuye más rápidamente en el citoplasma de los ratones *SLAMF8*^{-/-}, incrementando antes y en mayor cantidad en la membrana de los MΦ *SLAMF8*^{-/-} que en los ratones WT.

Como control de carga en esta figura se utilizó p22^{phox}, pero como podemos observar éste está incrementado en extracto de membrana de los ratones *SLAMF8*^{-/-}. Este hecho ha sido descrito también por Jutras *et al.* (2007), que observa un incremento en el fagosoma de

gp91^{phox} y p22^{phox} en MΦ estimulados con IFNγ respecto a las células en estado de reposo cuando aísla fagosomas. Este resultado ocurre en coherencia con lo observado en el estudio de Microscopia Confocal en el que se observaba mayor fluorescencia en esta subunidad tras activación con PMA en el citoplasma (Fig. 29 y 30), que podría estar asociado a una aceleración en los procesos de vesiculación. Esto provocaría una fusión más temprana de vesículas que da como resultado una mayor fluorescencia o como ocurre aquí, mayor detección de esta subunidad en la porción de membrana por el *Western Blot* (Fig. 36)

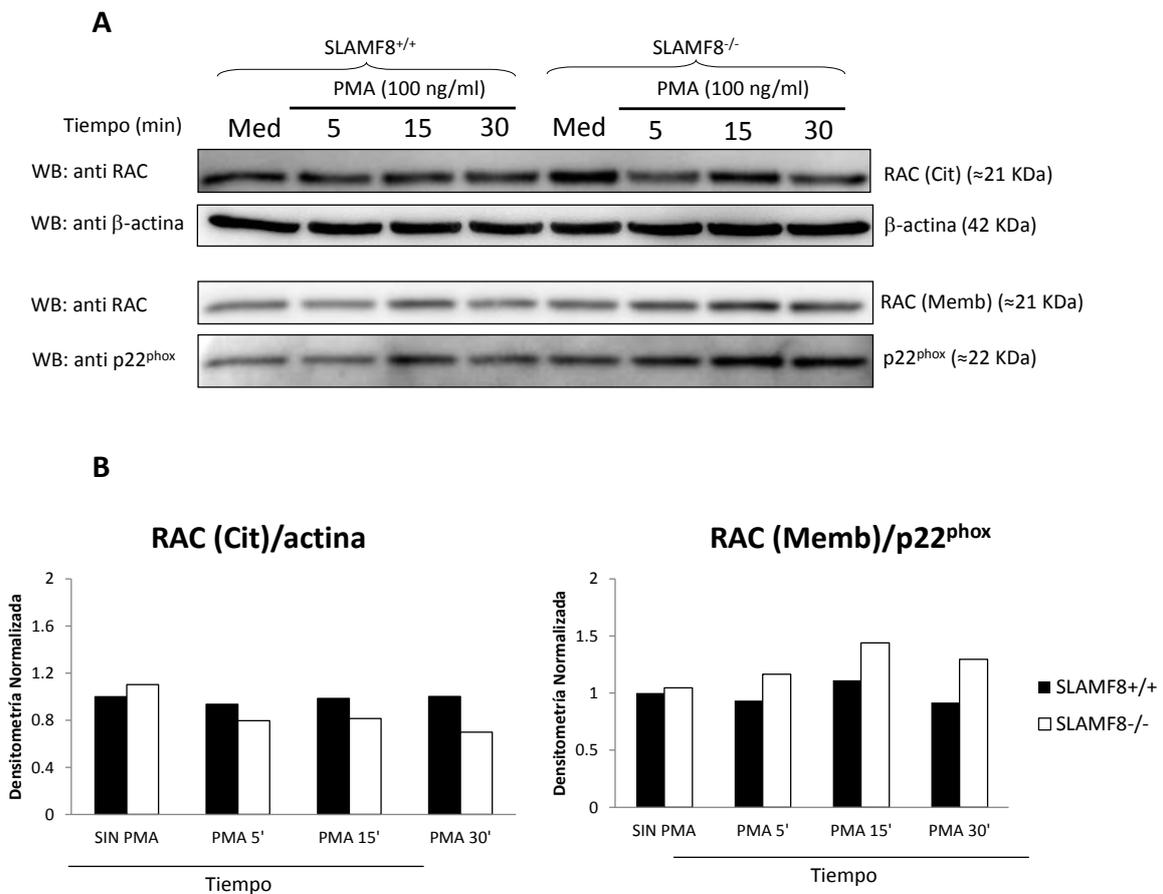


Figura 36 | **Translocación de RAC a la membrana.** *Immunoblotting* de proteínas citosólicas y de membrana marcado con anti RAC [2, Cell Signaling] en MΦ peritoneales, obtenidos con TGC, de ratones *SLAMF8*^{-/-} y WT activados con PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos. RAC es translocado a la membrana a tiempos más tempranos y en mayor cantidad en los ratones *SLAMF8*^{-/-} que en MΦ de los ratones WT. (B) Análisis por densitometría del *Immunoblotting* de la translocación de RAC a la membrana. RAC en el citoplasma (B1) y en la membrana (B2) de MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} y WT, obtenidos con TGC, y activados con PMA (100 ng/ml) a diferentes tiempos. La translocación de RAC ocurre más rápidamente y en mayor cantidad en los MΦ de los ratones *SLAMF8*^{-/-} que en los MΦ de los ratones WT. Datos representativos de 3 experimentos independientes.

7.- Determinación de la actividad bactericida in vivo.

Puesto que los MΦ *SLAMF8*^{-/-} muestran una mayor activación de la NADPH oxidasa y como resultado una mayor producción de ión superóxido, cuyo papel es muy importante en la eliminación de bacteria, nos cuestionamos si los ratones deficientes en *SLAMF8* presentaban una capacidad microbicida alterada en comparación con los ratones salvajes.

Para responder a ello, se realizó un ensayo donde se comparaba la capacidad de eliminación de *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) *in vivo* en ratones *SLAMF8*^{-/-} con respecto a los ratones WT. En estos ensayos se utilizaron dos cepas de *Salmonella*: *S. typhimurium* y SSEB (cepa atenuada). Los ratones no son capaces de eliminar *S. typhimurium*, por lo que se inyectan vía intraperitoneal ambas cepas conjuntamente y en cantidades iguales, siendo la cepa salvaje un control de la infección y la cepa atenuada necesaria para determinar la capacidad microbicida.

Como se muestra en la figura 38, la actividad bactericida de los ratones *SLAMF8*^{-/-} resultó ser significativamente mayor a la que presentaban los ratones WT. El número de unidades formadoras de colonias aisladas de ratones *SLAMF8*^{-/-} fue inferior que en los ratones WT, tanto al estudiarlo en hígado (Fig. 38A) como en bazo (Fig. 38B).

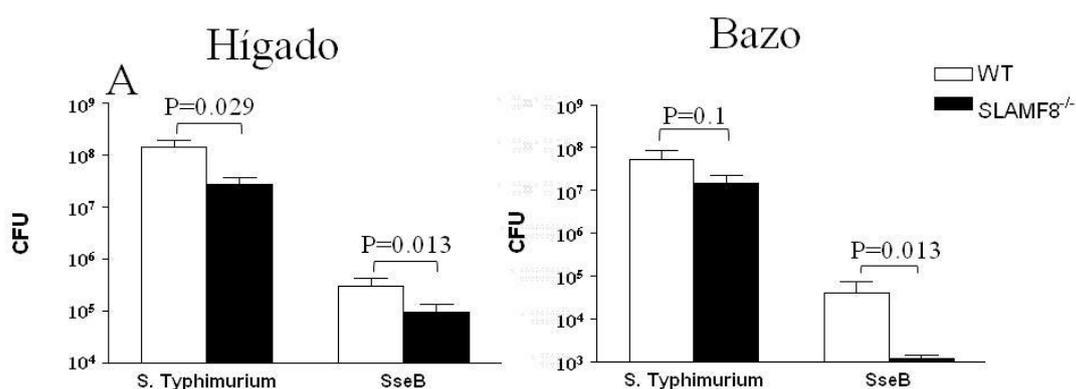


Figura 38 | Estudio de la capacidad bactericida *in vivo* en ratones *SLAMF8*^{-/-} y salvajes. Unidades formadoras de colonias tras 24 h. de la infección con *Salmonella* en hígado (A) y bazo (B). Los ratones *SLAMF8*^{-/-} eliminan *Salmonella* SSEB más eficientemente que los WT. Análisis en GraphPad con el test U de Mann-Whitney. N=4.

Teniendo en cuenta que *S. typhimurium* es una bacteria particular que utiliza mecanismos de escape para la actividad microbicida en MΦ [250], analizamos si el efecto observado *in vivo* en los ratones SLAMF8, pudiera deberse a una mayor actividad NADPH oxidasa. Utilizando el reactivo lucigenina, como se hizo anteriormente observamos que, en MΦ *SLAMF8*^{-/-} se produjo una cantidad de anión O₂^{•-} significativamente mayor que los MΦ WT infectados con bacteria *S. typhimurium* SSEB. Estos resultados son de gran interés, pues sugieren a esta molécula como una potente diana terapéutica para poder modular la capacidad microbicida en MΦ (Fig. 39).

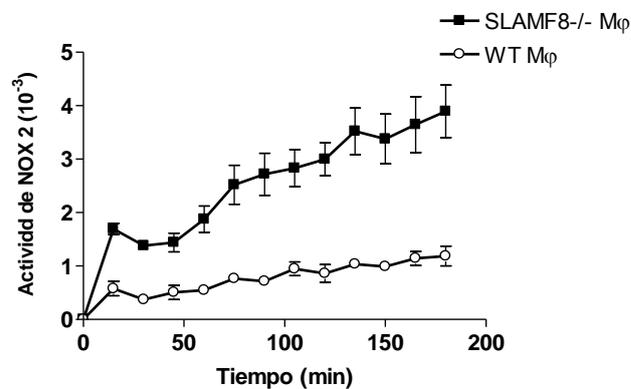


Figura 39 | **Detección de la generación de O₂^{•-} usando quimioluminiscencia amplificada por lucigenina en macrófagos *SLAMF8*^{-/-} y salvajes con *S. typhimurium* SSEB.** (A) Generación de O₂^{•-} en MΦ *SLAMF8*^{-/-} y MΦ WT tras activación con *S. typhimurium* SSEB. Los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} muestran mayor producción de O₂^{•-} que los MΦ WT cuando fueron infectados *in vitro* con esta bacteria. P<0.0001. Este experimento fue realizado por triplicado.

DISCUSIÓN

Las moléculas de la familia del SLAM se describieron en un principio como correceptores que intervienen en la transmisión de la señal intracelular en células T y NK. Se sabe que la interacción entre estas moléculas con sus respectivos ligandos no solo implica su activación, sino que también son capaces de modular muchos más mecanismos, siendo estos correceptores un elemento clave en la respuesta inmunitaria innata y específica [5]. Además, estudios recientes han descrito una expresión diferencial de miembros de esta familia comprometiendo la diferenciación y linaje de células hematopoyéticas [5, 6]. Por otro lado, algunos miembros de la familia del SLAM como CD48 y SLAMF1, funcionan como receptores de microorganismos expresados en distintas células de origen hematopoyético [7-11]. Destacar además la reciente relación del *loci* para los genes del SLAM, bien por polimorfismos o isoformas derivadas de combinaciones alternativas de RNA, con la susceptibilidad a lupus eritematoso sistémico (LES). Tanto en humano como en ratón se ha señalado la implicación de algunos miembros de la familia del SLAM, junto a otros genes, como mecanismos epistémicos que predisponen a una pérdida de autotolerancia frente a proteínas nucleares [5, 229].

El trabajo presentado en esta tesis se basa en el estudio de SLAMF8 y en concreto en el papel que desempeña este receptor en el MΦ durante la activación del mismo, centrándonos en el efecto que tiene la deficiencia de SLAMF8 sobre la NADPH oxidasa. Hemos analizado algunos de los mecanismos moleculares que regulan la activación de producción de ROS, identificando las principales rutas de activación que se ven involucradas. Nuestro estudio es otro claro ejemplo de las funciones críticas que realizan los miembros de esta familia en el desarrollo de la respuesta innata, más allá de ser moléculas de adhesión en las células de origen hematopoyético en las que se expresan.

En este estudio se han utilizado cultivos primarios no transformados de MΦ peritoneales obtenidos con TGC. Esta metodología es ampliamente utilizada para estudios funcionales en estas células y nos permite la obtención de numerosos macrófagos con alta expresión de SLAMF8 [211]. En dicho modelo celular, aproximadamente entre el 80-90 % de las células que se obtienen entre el tercer y cuarto día tras inyección con TGC son MΦ. Al caracterizar estas células, con una batería de anticuerpos frente a los antígenos de superficie más usuales, se pudo determinar que la población mayoritaria estaba representada por MΦ CD11b⁺F4/80⁺, y una proporción de Mo F4/80^{low}-CD11B⁺Ly6C^{+/-}. No se observaron diferencias entre el lavado peritoneal obtenido en ratones WT y el de los ratones SLAMF8^{-/-} (Fig. 6). Debemos señalar aquí que los fenotipos antigénicos característicos de MΦ en comparación o

distinción con otros leucocitos, como las DC o Mo, no están tan claramente delimitados. Es evidente hoy en día que estas poblaciones expresan gran variedad de receptores comunes a todas. Esto hace difícil la clasificación solo por la expresión de los mismos, ya que la variedad de poblaciones es mucho mayor de lo que se imaginaba hace unas décadas. Por tanto, la caracterización de la población no puede limitarse al fenotipo definido por los anticuerpos, sino también por las características funcionales, que ponen de manifiesto qué tipo de células estamos analizando [73]. Teniendo en cuenta todo esto concluimos que, la alta expresión de F4/80 y CD11b, la capacidad fagocítica y de activación de la NADPH oxidasa en la población que estudiamos, claramente define a la población analizada como MΦ [1, 80].

Nos gustaría puntualizar que la característica funcional observada en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} obtenidos de peritoneo con TGC, se muestra también en los MΦ derivados de médula ósea *in vitro*. Es por esto que nuestro trabajo se centró en los primeros, salvo en algunos experimentos con objeto de corroborar algunos resultados (Fig. 13) [1].

Estudio de la actividad NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales de ratón.

SLAMF8 se expresa en diversas células de origen hematopoyético, concretamente en DC, Mo y MΦ principalmente, y en una subpoblación de células B maduras [5, 20, 138]. El hecho de que SLAMF8 se expresara abundantemente en MΦ, evidenciaba un papel en los mismos al igual que en otros miembros de la familia [110, 133, 203], de modo que nos planteamos si SLAMF8 participaba en la función microbicida del MΦ. Además, la expresión de SLAMF8 está ligada a activación de fagocitos. Nosotros y otros autores demostramos que, tanto en humano como en ratón, la expresión de este miembro de la familia del SLAM está ligada al estado de activación de la célula, siendo la detección nula o muy baja en células en reposo (Fig. 32 y 33) [1]. La expresión de SLAMF8 incrementa cuando los Mo y MΦ sufren algún tipo de estímulo. De hecho, los MΦ peritoneales en reposo no muestran diferencias en la producción de O₂^{•-} [1]. Todo esto indica en principio que SLAMF8 interviene en procesos relacionados con la funcionalidad de los MΦ en la primera línea de defensa, la acción microbicida o la respuesta innata.

Al analizar la actividad de la NADPH oxidasa en el MΦ, sorprendentemente, y a diferencia de lo que ocurre con SLAMF1 [110], los MΦ de ratones *SLAMF8*^{-/-} presentaban una mayor producción de O₂^{•-} en respuesta a PMA y bacteria, *E. coli* o *S. aureus*, respecto a los MΦ procedentes de ratones WT. Esta diferencia en la producción de O₂^{•-} era significativamente mayor, llegando a ser hasta 3 veces superior tras activar con PMA y o con bacteria (Fig. 4A y 4B). Este fenómeno ocurre frente a distintos tipos de estímulos, sin distinción entre bacteria GRAM negativa o positiva, lo que presenta a SLAMF8 como guardián de la actividad de NADPH oxidasa independientemente del estímulo.

Podríamos pensar que el hecho de la introducción del gen de neomicina pudiera ser el responsable del efecto observado en los ratones *SLAMF8*^{-/-}, o bien por expresión de proteína truncada. En este estudio no hemos observado expresión de RNA que pudiera dar lugar a alguna porción funcional de la proteína. Por otro lado, hemos analizado la expresión de SLAMF1 en los MΦ por si la inserción del nuevo gen modificaba la expresión de éste en los ratones *SLAMF8*^{-/-}, al estar el gen para SLAMF8 próximo al *loci* de la familia, y no hemos observado diferencia alguna en la expresión de SLAMF1 entre los MΦ WT y los MΦ *SLAMF8*^{-/-}.

Dada la importancia que tiene la formación de fagosomas en la activación de la NADPH oxidasa [12-14], decidimos estudiar si los MΦ *SLAMF8*^{-/-} tenían alterada la capacidad fagocítica. Tras este estudio comparativo se descartó que la acrecentada activación de la NADPH oxidasa fuera dependiente de una mayor fagocitosis de bacteria ya que, tanto los MΦ *SLAMF8*^{-/-} como los WT, mostraron una capacidad fagocítica similar al ser estimulados con *E. coli* como con *S. aureus* (Fig. 8).

Ha sido descrita por varios autores la variabilidad de la actividad del enzima NADPH oxidasa entre distintos leucocitos [230, 231]. Como hemos comentado anteriormente en esta sección, nosotros no hemos observado diferencia en las poblaciones aisladas de peritoneo entre MΦ WT y *SLAMF8*^{-/-}, por lo que el fenotipo observado no se debe a diferencias en la proporción de algunas poblaciones, que pudieran ser las causantes de una mayor producción de O₂^{•-}. En colaboración con el grupo del Dr. C. Tehorst, y en concordancia con estos resultados, hemos demostrado que la sobre-expresión de SLAMF8 en MΦ invierte este fenotipo [73] (Fig. 19-21). Dados estos resultados podemos decir que el fenotipo observado se debe a la deficiencia en la expresión de SLAMF8 en los MΦ. El objetivo siguiente fue estudiar las vías de activación de NADPH oxidasa frente a los distintos estímulos.

Estudio de las rutas de activación de la NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales *SLAMF8*^{-/-}.

Basándonos en los resultados expuestos anteriormente se analizó si esta actividad aumentada de la NADPH oxidasa en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} se debía a una mayor fosforilación de las subunidades que constituyen este complejo por las distintas rutas de señalización implicadas en la activación del complejo. El proceso de fosforilación y ensamblaje de las subunidades de la NADPH oxidasa parece estar regulado por diferentes quinasas, entre las destacan, PI3K, la proteína quinasa C (PKC), y p38 MAP quinasa [15-19].

Regulación de *SLAMF8* sobre la ruta de activación de PKC.

La fosforilación de los componentes de la NADPH oxidasa por la PKC ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de inhibidores de señal o con proteína trucada y técnicas de sobreexpresión de proteínas, demostrando que ésta juega un papel importante en la regulación de la fosforilación de los componentes de esta oxidasa [209, 212].

La primera observación sobre la alta producción de O₂⁻ en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} fue detectada cuando éstos eran estimulados con PMA, conocido como un potente estimulador de las distintas isoformas de PKC. Las quinasas PKC fosforilan en serinas y treoninas, y entre sus sustrato se encuentran todas las subunidades phox del enzima NADPH oxidasa [12, 13, 208, 232, 233], por lo que ésta fue la primera ruta de activación del complejo analizada. Para conocer si los componentes de la NADPH oxidasa estaban más fosforilados en ausencia de *SLAMF8*, se llevó a cabo un análisis mediante *western blot* de la fosforilación de la subunidades citosólicas p47^{phox}, el componente más estudiado y mejor conocido, así como p40^{phox}. Se ha demostrado que la activación de estas dos subunidades es crucial para el buen ensamblaje del enzima, puesto que p47^{phox} se ensambla por su región prolina con la región SH3 de p67^{phox}, y éste se une a p40^{phox} por el dominio PB1 de ambos [149, 234]. Cuando p47^{phox} es fosforilado se une a p22^{phox} por la región prolina de manera que p40^{phox} y p67^{phox} son trasladados a la membrana. En ausencia de activación de p47^{phox} no podrían ser trasladados. Por otro lado, la fosforilación de p40^{phox} y p47^{phox} deja libre su región PX que permite que ambas interaccionen

con fosfoinositol fosfatos de membrana, determinante también para la activación del enzima [211, 233, 235].

Con el uso del anticuerpo frente a motivos serina fosforilados por la PKC, se pudo determinar que p47^{phox} y p40^{phox} presentan mayor fosforilación en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} en comparación con los MΦ WT estimulados con PMA (Fig. 10) [211]. Estos resultados se reprodujeron usando estímulos de diferente naturaleza. Los macrófagos peritoneales estimulados con bacterias GRAM negativa (*E. coli*), así como con GRAM positiva (*S. aureus*), mostraron más cantidad de ambas subunidades fosforiladas (Fig. 11 y 12). El uso de esta estrategia nos permitió analizar la activación por PKC cuando se estimula con bacteria. Hasta ahora son menos los estudios de fosforilación de las subunidades de la NADPH oxidasa con bacteria completa, ya que normalmente se analizan mediante el uso de PMA o diferentes productos purificados. Este hecho ha determinado que las rutas de activación con bacteria completa no están bien definidas. Además nos ha permitido determinar que una de las causas de mayor activación del enzima NADPH oxidasa es debida a una mayor fosforilación por PKC de al menos estas dos subunidades.

Con objeto de confirmar todo esto, se analizó la fosforilación de la subunidad p40^{phox} con el uso de un anticuerpo que reconocía específicamente esta subunidad fosforilada en la Thr154, también sustrato de la PKC [144, 233]. Estos experimentos demostraron que realmente hay mayor fosforilación por PKC de esta subunidad, comentada anteriormente, en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} tras una estimulación con PMA, *S. aureus* y *E. coli* (Fig. 14-17). Sin embargo, observamos que la señal, y por tanto fosforilación de p47^{phox} y p40^{phox} con LPS, era nula o algo débil (Fig. 15) y sólo pudo ser detectada cuando era analizada con anticuerpo frente a Thr154 de p40^{phox}. La activación de NADPH oxidasa y producción de superóxido mediante LPS ha sido ampliamente demostrada [149, 234, 236-238]. Además, hay estudios que demuestran la capacidad de distintos TLR y de LPS de activar PKC [236, 237], aunque en estos trabajos se estudian las mismas subunidades fosforiladas a tiempos más largos que los utilizados aquí y utilizando inmunoprecipitación. Pacquellete y col., 2007 [239] describen que la activación con la NADPH oxidasa a través de TLR-4, utilizando LPS como estímulo, induce fosforilación en Ser y Thr, mientras que PMA solo fosforilaría en Ser. El uso de los anticuerpos y estímulos utilizados aquí muestran lo contrario, pues nosotros no observamos fosforilación en Ser con LPS, pero si observamos algo de fosforilación en Thr de p40^{phox} con PMA, y de hecho, es mayor en MΦ *SLAMF8*^{-/-}. Podemos decir que diferentes estímulos provocan una activación diferencial de cada ruta y en consecuencia la fosforilación de distintos motivos en Ser y Thr de

las subunidades del enzima. Estas diferencias, y los tiempos y técnicas utilizadas, pueden ser la causa de la poca detección de proteínas p40^{phox} y p47^{phox} en nuestros ensayos cuando estimulamos con LPS. Por esta misma razón, cuando utilizamos la bacteria completa sí detectamos fosforilación de estas subunidades ya que son varios los receptores que intervendrían: TLR, fMLP-R, depuradores, lo que provocaría activación de NADPH oxidasa por diferentes rutas [239], en contraste con la activación con LPS puro. Es importante mencionar que las diferencias pueden venir dadas también por el tipo de células utilizadas, según sean humanas o de ratón, neutrófilos o MΦ.

Concluimos, por tanto que, las estimulaciones con bacteria demuestran una mayor fosforilación de las subunidades citoplasmáticas p47^{phox} y p40^{phox} dependiente de la activación por PKC en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} en comparación con MΦ WT, dando importancia a esta vía independiente de qué rutas están implicadas en la activación de PKC [217, 239, 240].

Para descartar que los resultados conseguidos por nuestro grupo pudieran ser un artefacto provocado por el uso de MΦ peritoneales obtenidos con TGC, se examinó la fosforilación de p47^{phox} en MΦ de ratón WT procedentes de médula ósea (BMMO), observando que este efecto era perfectamente reproducible, al menos tras estimular con PMA (Fig. 13). En ratón, observamos una mayor producción de O₂^{•-} cuando las células deficientes en *SLAMF8* en presencia de PMA o de bacteria (Fig. 4). En consonancia con este hecho, cuando las células son incubadas con IFN γ , citoquina que induce máxima expresión de *SLAMF8*, observamos un detrimento en la activación de la NADPH oxidasa por PKC (Fig. 19-21). Recientemente, otros receptores de la familia del SLAM han sido relacionados con la actividad de NADPH oxidasa [5, 133, 203]. Aunque aún está por dilucidar cuál es el mecanismo exacto para este proceso, sabemos que al menos *SLAMF1* controla el proceso de activación de NADPH oxidasa, y de la bomba de protones, a través de Vav-1 [5, 133, 203]. En el caso de *SLAMF8* tampoco se sabe el mecanismo, aunque es conocido que la activación de PKC ocurre a través de numerosas enzimas, como receptores de tirosina quinasa, receptores de GTPasas y factores de crecimiento [208]. El conocimiento del mecanismo mediante el cual *SLAMF8* modularía rutas de activación de NADPH oxidasa junto a otros receptores sería de gran interés y objeto de estudios más profundos en un futuro.

Regulación de SLAMF8 sobre la ruta de activación de p38 MAPK.

Una vía que contribuye a la activación de la NADPH oxidasa, y que hasta hace poco más de una década se le viene dando mayor importancia, es la activación de las MAPK [15, 17, 19, 192, 211, 215, 241, 242]. En los últimos años, han sido numerosos los estudios en los que se pretende comprender las rutas que relacionan p38 MAPK con la activación de la NADPH oxidasa, y aunque se ha estudiado esta conexión en distintos tipos celulares y condiciones, siguen sin conocerse con exactitud en el MΦ de ratón o de humano. Se ha descrito que p38 MAPK fosforila tanto a p47^{phox} como a p67^{phox}, al menos en neutrófilos humanos [171, 243]. Además, parece tener un efecto sobre las GTPasas RAC [184]. Todo ello sugiere que p38 MAPK podría estar participando de manera indirecta a través de RAC, o directa, en la fosforilación de las subunidades citosólicas del complejo NADPH oxidasa del MΦ y en consecuencia regulando la actividad del enzima [17, 192].

Una vez analizada la activación de las subunidades citosólicas p40^{phox} y p47^{phox} de la NADPH oxidasa, se analizó si la ruta de la p38 MAPK estaba modificada en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} obtenidos con TGC. El análisis mediante *western blot* desveló que existía más cantidad de p38 MAPK fosforilada en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} en comparación con los MΦ WT tras estimular con PMA (Fig. 22). Esta mayor activación de la p38 MAPK se confirmó tras estimular con LPS y bacteria, *E. coli* y *S. aureus* (Fig. 23-25). Nos gustaría señalar que las MAPK fosforilan en Ser y Thr, y que tanto p40^{phox} como p47^{phox} presentan motivos de fosforilación de p38 MAPK, según demuestra el análisis proteico sobre motivos de acción de enzimas.

Analizando detenidamente estos resultados hemos observado que, a diferencia de lo que ocurre sobre las subunidades de NADPH oxidasa en relación con LPS, la fosforilación de la quinasa p38 MAPK en MΦ de ratón es más rápida y acusada que aquellas con este mismo estímulo. Esto puede deberse a que la activación de MAPK ocurra directamente e independiente a la producción de ROS [17]. Nosotros detectamos p38 MAPK fosforilada en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}, acompañado por un incremento de O₂^{•-}, tanto cuando activamos directamente PKC con PMA y con el resto de estímulos, ya sea bacteria o LPS. Este resultado es lógico según lo descrito por Laroux y col., (2005) [211] que manifiestan una menor producción de O₂^{•-} y

fosforilación de las subunidades p47^{phox} y p38 MAPK en MΦ deficientes en MYD88 [220]. Todo esto nos lleva a afirmar que p38 MAPK puede ser también responsable del fenotipo observado en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}. De hecho, se observa la fosforilación de este enzima a tiempos más cortos que los observados para la fosforilación por el mismo estímulo de p47^{phox} y p40^{phox}. Creemos pues que, una activación directa, dependiente de ROS, o indirecta de p38 MAPK contribuye a una mayor producción de superóxido en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}.

Regulación de SLAMF8 sobre la movilización de de RAC-GTPasas.

Las proteínas RAC GTPasas participan de la regulación y activación de NADPH oxidasa. La importancia de la interacción de RAC2 en la NADPH oxidasa se ha demostrado mediante ratones deficientes para esta subunidad, y en humanos su deficiencia provoca la enfermedad granulomatosa crónica. Esto es debido a que a su unión con p67^{phox} es esencial para el transporte último de electrones y formación de O₂^{•-} [244]. RAC1 parece ser más importante en monocitos humanos. Existen múltiples estudios realizados en distintos sistemas celulares, y en respuesta a distintos estímulos, en los que se relacionan rutas de activación de las RAC-GTPasas con p38 MAPK [184, 196-198, 245, 246], por lo que era lógico pensar que la movilización de RAC estuviera incrementada en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de RAC ocurre por vías paralelas a la activación de otros miembros del enzima, p91^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}, y se induce independiente de la activación del complejo por PKC [220, 221]. Las RAC GTPasas pueden ser activadas por distintos GEF activados, bien por PIP3, receptores dependientes de proteína G o dependientes de fosforilación en tirosinas como VAV-1. Para analizar si la ausencia de SLAMF8 también tiene un efecto sobre RAC y en consecuencia sobre la regulación de la NADPH oxidasa se analizó la migración a membrana de esta GTPasa. Este estudio demostró que la movilización de RAC GTPasa desde el citoplasma hacia la membrana es más rápido y de mayor intensidad en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} en comparación con los MΦ procedentes de ratones WT (Fig. 36). Estos datos sugieren que la deficiencia de SLAMF8 afecta a la GTPasa RAC en su función reguladora de la actividad de la NADPH oxidasa, junto con la p38 MAPK y la PKC.

Como ya hemos comentado, la activación de RAC GTPasas puede estar mediada por distintos factores y puede regular otros procesos incluido una mayor activación de p38 MAPK.

La regulación de la NADPH oxidasa a través de RAC también podría estar mediada directamente por la p38 MAPK activada vía PI3K, ya que existen evidencias de la relación de esta MAPK con RAC, tal y como demostraron Yamamori y col., [184] en neutrófilos bovinos. Nosotros observamos incrementado RAC y p38 MAPK tanto cuando se estimula directamente PKC con PMA, como cuando se estimula con bacteria o LPS en MΦ de ratón WT, y observamos un incremento respecto a éstos en los ratones *SLAMF8*^{-/-}. Esto indica que ambas proteínas participan en el proceso y que tanto RAC como p38 MAPK pueden provocar una activación recíproca que contribuiría en la activación de NADPH oxidasa.

Como control de carga en los extractos de membrana se usó p22^{phox}. Sorprendentemente, esta subunidad de membrana se mostraba incrementada en las fracciones de los ratones *SLAMF8*^{-/-}, resultado que también pudo ser observado en el estudio de microscopía confocal, en el que se mostraba una mayor fluorescencia de esta subunidad tras la activación con PMA (Fig. 29 y 30). El incremento de p22^{phox} en membrana podría estar asociado a una aceleración en los procesos de vesiculación que provocaría una fusión más temprana de vesículas y en consecuencia una mayor fluorescencia que se traduciría en una mayor detección de esta subunidad en la porción de membrana por el *Western Blot*.

Reclutamiento de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox} de la NADPH oxidasa por Inmunofluorescencia.

La activación de la NADPH oxidasa requiere la fosforilación de los componentes de este complejo enzimático y el ensamblaje de los mismos a la membrana de las vesículas que posteriormente se fusionan al fagosoma y a la membrana plasmática. Son frecuentes los análisis de microscopía confocal para el estudio de estas y otras moléculas asociadas en procesos de transporte y fusión de vesículas [12, 211, 231, 247, 248]. Cuando se estudió por microscopía confocal el reclutamiento de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox}, componente citosólico y de membrana respectivamente, tras la activación de MΦ con PMA, se pudo comprobar que el reclutamiento de ambas subunidades de la NADPH oxidasa ocurría de manera más abundante en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} activados. Es más, el reclutamiento de p47^{phox} y de p22^{phox} parece estar acelerado en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} estimulados con PMA, para posteriormente llegar a una intensidad similar que en los MΦ WT fue a los 15 min. Pensamos que al igual que para otras proteínas, la intensidad de fluorescencia de p47^{phox} se

correspondería con el reclutamiento de esta subunidad citosólica a la membrana de la vesícula, mientras que la intensidad de fluorescencia de la subunidad p22^{phox} estaría relacionado con la fusión de las vesículas. En este estudio, el reclutamiento de p22^{phox} resultó ser mayor en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} activados con PMA tanto a los 5 min. como a los 15 min. (Fig. 29 y 30). En el caso de p47^{phox}, sin embargo, los valores relativos de la intensidad de fluorescencia en el reclutamiento de esta subunidad fueron mayores sólo en los primeros 5 min. en los MΦ peritoneales *SLAMF8*^{-/-} respecto a los MΦ WT (Fig. 27 y 28).

Podemos concluir, con estos ensayos de microscopía, que el reclutamiento de las subunidades de NADPH oxidasa favorecería la fusión de vesículas portadoras del enzima tras estimular tanto con PMA como con bacteria *E. coli* (F18). Este efecto, contribuiría a aumentar la actividad de la NADPH oxidasa en los MΦ *SLAMF8*^{-/-} produciéndose así más cantidad de ROS, tal y como observamos en los ensayos con lucigenina. Sería interesante profundizar más en el mecanismo de reclutamiento y analizarlo con distintos tipos de estímulos, como bacteria GRAM positiva, o incluso en otros microorganismos en los que este proceso está modificado como mecanismo de escape a la acción microbicida (*S. typhimurium* o *Mycobacterium tuberculosis*). Este es uno de los objetivos de trabajo actualmente en nuestro laboratorio [249, 250].

Función de SLAMF8 en monocitos humanos.

Una vez demostrado el papel regulador de SLAMF8 sobre la NADPH oxidasa en los MΦ peritoneales de ratón quisimos confirmar si este fenómeno era reproducible en Mo humanos de sangre periférica. Para ello se estudió el efecto que conllevaba un aumento de SLAMF8 en Mo humanos inducido por el IFN γ .

Los monocitos humanos de sangre periférica aumentan los niveles de expresión de RNA mensajero para SLAMF8 tras ser estimulados con IFN γ (Fig. 32) [1, 20]. Este aumento en el mensajero se correlacionó con una mayor expresión de la proteína en la superficie del Mo como se pudo detectar por FACS (Fig. 33). El análisis por *western blot* mostró que la fosforilación de p47^{phox} (Fig. 34) desciende cuando aumenta la expresión de SLAMF8 inducida por el IFN γ , en concordancia con los resultados observados en MΦ peritoneales de ratón en ausencia de SLAMF8. Estos datos sugieren que SLAMF8 pueda ejercer también un papel

regulador en la NADPH oxidasa en Mo y MΦ humanos como ocurre en los de ratón. En cambio el análisis en estos ensayos de la quinasa p38 MAPK mostrarán una mayor fosforilación de ésta en los Mo tratados con IFN γ (Fig. 35). No es extraño que la activación de la p38 MAPK se vea aumentada en los Mo tratados con IFN γ [251], ya que la exposición a este factor induce activación p38 MAPK. Es posible que la ausencia de SLAMF8 tenga efecto sobre la actividad de la p38 MAPK, no apreciable en comparación con la potente acción del IFN γ sumada a la estimulación con PMA.

Resumiendo, pensamos que SLAMF8 parece tener una función moduladora negativa sobre la NADPH oxidasa en los Mo humanos de sangre periférica, equivalente a la observada en los MΦ peritoneales de ratón. Este hallazgo no es de extrañar dado que el porcentaje de analogía entre SLAMF8 humano y de ratón es próximo al 75 % [20, 204]. Además, la expresión e inducción de SLAMF8 resultó similar en ambas especies (Fig. 18 y 32).

Estudio de la actividad microbicida *in vivo*.

La producción de ROS es esencial para una eliminación eficiente de bacteria, dado que los ROS son tóxicos para los microorganismos y además actúan como segundos mensajeros activando otros mecanismos microbicidas como, control del pH en el fagosoma, proteólisis, maduración del fagosoma, etc. Nos planteamos pues si la actividad microbicida *in vivo* estaría afectada en los ratones *SLAMF8*^{-/-} [252].

Al analizar la actividad bactericida de los ratones BALB/c *SLAMF8*^{-/-} en un ensayo basado en la supervivencia de una cepa atenuada de *Salmonella* en el ratón, obtuvimos que la capacidad microbicida en los ratones *SLAMF8*^{-/-} resultó ser más eficiente frente a *Salmonella* que los ratones WT (Fig. 33). Estos resultados son coherentes con el hecho de que los MΦ *SLAMF8*^{-/-} tienen aumentada la actividad NADPH oxidasa. Es más que probable, puesto que la extracción de los órganos analizados, bazo e hígado, se realizó a las 24 h. de la infección, que la eliminación de la bacteria se llevara a cabo además por otros tipos celulares y no sólo por el MΦ. Estos resultados sugieren que SLAMF8 debe tener un papel similar en otros fagocitos como neutrófilos, que predominan en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria, o DC. Se conoce también la implicación de NADPH oxidasa en mecanismos posteriores al proceso innato, como es la presentación del antígeno, por lo que un mejor aclaramiento de las

bacterias, en los ratones *SLAMF8*^{-/-}, podría deberse también al efecto que pueda tener la presentación de antígenos por parte de MΦ y DC en la respuesta específica [253]. Es sabido que *S. typhimurium* utiliza mecanismo de escape al sistema inmunitario, entre otros evitando acidificación del fagosoma y fusión con lisosomas [17, 250, 254, 255]. En un estudio en desarrollo en nuestro laboratorio y en colaboración con el laboratorio del Dr. Terhorst demostramos que los MΦ *SLAMF8*^{-/-} esta acelerada la fusión de fagosomas (experimentos en vías de publicación) y existe una menor acidificación en los fagosomas [1]. Todo esto estaría, por tanto, contribuyendo a la eliminación de la bacteria de forma más efectiva en los ratones *SLAMF8*^{-/-}. En concordancia con todo ello se ha visto, en estudios *in vivo* realizados en otros miembros de la familia del SLAM, como es el caso de *SLAMF1* y *Ly108*, cuyo fenotipo es opuesto al que se observa en los ratones deficientes en *SLAMF8*, que los ratones deficientes para estas proteínas son muy susceptibles a *S. typhimurium*, mostrando un defecto en la eliminación de bacteriana [133].

Función de SLAMF8 en macrófagos de ratón.

En este trabajo se ha podido determinar el papel, o al menos uno de ellos, que desempeña *SLAMF8* en el MΦ de ratón y probablemente en el MΦ de humano. Basándonos en todos los datos mostrados en esta tesis se puede concluir que *SLAMF8* actúa como modulador negativo de la NADPH oxidasa actuando sobre las principales rutas de regulación de dicho enzima: PKC, p38 MAPK y RAC GTPasa. Aún quedaría por determinar cómo afecta la ausencia de *SLAMF8* directamente sobre PI3K, que es activada por numerosos receptores de membrana en las células innatas [15, 189, 256, 257] y cuya activación es esencial para el buen funcionamiento de la NADPH oxidasa, pues cataliza la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato y por tanto activación de PKC en estos procesos. El hecho de que todas estas vías estén aumentadas en los MΦ *SLAMF8*^{-/-}, hace sospechar que *SLAMF8* debe modular en un momento inicial de la activación, probablemente en un punto común a estas vías de activación y que por tanto influirá regulando procesos cruciales para la funcionalidad de los MΦ, como presentación de antígeno o formación de vesículas. Sería muy interesante conocer si *SLAMF8* ejerce una función similar en neutrófilos o DC, células de origen hematopoyético en las que también se expresa y que son esenciales en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Para todo ello sería necesario describir los mecanismos moleculares por los que *SLAMF8* modula

estos mecanismos. Al contrario de lo que ocurre con SLAMF6 o SLAMF1, SLAMF8 posee una cola citoplasmática corta en la que no se reconocen motivos de señalización u otras secuencias para reconocimiento de proteínas de transmisión de señal [5, 20]. Esta característica está presente en otras moléculas de la familia del SLAM, como es el caso de CD84-H1 y CD48. Mientras que CD84-H1, al igual que SLAMF8, no presenta motivos de unión a moléculas adaptadoras en su cola corta citoplasmática, el CD48 se ancla a la membrana por medio de GPI y es capaz de transmitir la señal al citoplasma asociado a las denominadas balsas lipídicas [89, 258]. El hecho de que aún no se hayan desarrollado buenos anticuerpos frente a SLAMF8 hace que estos mecanismos sean más difíciles de dilucidar. Por sus características en base a la secuencia proteica se presume que SLAMF8 es una molécula de membrana de tipo I, con el extremo carboxi-terminal hacia el citoplasma y el amino terminal extra-citoplasmático. Nosotros pensamos que, como se ha demostrado para SLAMF1 [203], puede que forme parte de la membrana celular y puede además posteriormente modular acciones desde el fagosoma.

La función principal de la NADPH oxidasa es producir ROS antimicrobianos, pero estos también desempeñan distintos papeles no menos importantes como ser activadores de otras vías de señalización, participan en la quimiotaxis, juegan un papel crítico en la iniciación de la presentación cruzada del antígeno, modulando la respuesta inmunitaria. Estudios recientes han revelado un nuevo papel para la NADPH oxidasa en la activación de la autofagia [255, 259]. Además, existen cada vez más datos que sugieren que este enzima está implicado en ciertas enfermedades inflamatorias como es el caso de la artritis reumatoide, ya que una producción excesiva de ROS puede causar daños tisulares en el hospedador, amplificando así reacciones inflamatorias [260-262]. La producción de $O_2^{\bullet-}$ contribuye también a la oxidación de los lípidos y la formación de metabolitos de lípidos con bioactividad y toxicidad alterada que contribuiría significativamente al desarrollo de la aterosclerosis y al estado redox del entorno del sitio inflamatorio [175]. Es por ello que SLAMF8, regulador negativo de la NADPH oxidasa, podría ser objeto de estudio como una posible diana terapéutica en distintos tipos de enfermedades inflamatorias.

CONCLUSIONS

1.- SLAMF8 negatively modulates NADPH oxidase activity in mouse macrophages and monocytes stimulated with PMA, GRAM-positive and GRAM-negative bacteria, indicating that modulation of SLAMF8 on superoxide production is independent of stimulus causing the activation of NADPH oxidase.

2.- The negative modulation of SLAMF8 on the phagocyte NADPH oxidase activity is mediated by PKC and p38 MAPK activation pathways, that leads to increased phosphorylation of at least the two cytoplasmic subunits p47^{phox} and p40^{phox}. This activation occurs independently of the stimulus used.

3.- Recruitment and assembly of p47^{phox} and p22^{phox} subunits to phagosome and plasma membrane occurs earlier in *SLAMF8*^{-/-} deficient macrophages than in wild type macrophages.

4.- The negative modulation of SLAMF8 on the phagocyte NADPH oxidase activity is caused in part by increased mobilization of RAC GTPase in *SLAMF8*^{-/-} macrophages, and is independent of the stimulus used.

5.- Increased SLAMF8 expression in human monocytes causes a reduction in the activation of the enzyme NADPH oxidase, indicating that SLAMF8 functions as a negative modulator in activated human monocytes. This negative modulation affects the phosphorylation of p47^{phox} and is dependent on the stimulation of the monocytes with IFN γ .

6.- The *in vivo* microbicidal capability of the *SLAMF8*^{-/-} mice is higher than the microbicidal capability of wild type mice, at least in the mouse model of sepsis using *Salmonella typhimurium*.

CONCLUSIONES

1.- SLAMF8 es un modulador negativo de la actividad NADPH oxidasa en macrófagos y monocitos de ratón cuando éstos son estimulados con PMA, bacteria GRAM negativa y bacteria GRAM positiva, lo que indica que la modulación de SLAMF8 sobre la producción de superóxido es independiente del estímulo que provoque la activación del NADPH oxidasa.

2.- La modulación negativa de SLAMF8 sobre la actividad NADPH oxidasa de fagocitos y esta mediada por las rutas de activación de las quinasas PKC y p38 MAP quinasa, lo que provoca una mayor fosforilación de al menos las subunidades citoplasmáticas p47^{phox} y p40^{phox}. Dicha activación ocurre independientemente del estímulo utilizado.

3.- El reclutamiento y acoplamiento de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox} hacia la membrana plasmática y del fagosoma ocurre antes en los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} que en los macrófagos procedentes de ratones salvajes.

4.- La modulación negativa de SLAMF8 sobre la actividad NADPH oxidasa de fagocitos es provocada en parte por una mayor movilización de RAC en los macrófagos *SLAMF8*^{-/-} independientemente del estímulo utilizado.

5.- El incremento de expresión de SLAMF8 en monocitos humanos provoca una reducción en la activación del enzima NADPH oxidasa, indicando una función moduladora negativa de SLAMF8 humano en la activación de los monocitos. Esta modulación negativa afecta a la fosforilación de p47^{phox} y es dependiente de la estimulación de los monocitos con INF γ .

6.- La capacidad microbicida de los ratones *SLAMF8*^{-/-} *in vivo* es superior a la capacidad microbicida de los ratones salvajes, al menos frente al modelo de septicemia provocado con la bacteria *Salmonella typhimurium*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Wang, G., Abadia-Molina, A. C., Berger, S. B., Romero, X., O'Keeffe, M. S., Rojas-Barros, D. I., Aleman, M., Liao, G., Maganto-Garcia, E., Fresno, M., Wang, N., Detre, C. and Terhorst, C.,** Cutting edge: Slamf8 is a negative regulator of Nox2 activity in macrophages. *J Immunol* 2012. **188**: 5829-5832.
- 2 **Bengis-Garber, C. and Gruener, N.,** Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cell Signal* 1996. **8**: 291-296.
- 3 **Murray, P. J. and Wynn, T. A.,** Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011. **11**: 723-737.
- 4 **Lambeth, J. D.,** NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 181-189.
- 5 **Calpe, S., Wang, N., Romero, X., Berger, S. B., Lanyi, A., Engel, P. and Terhorst, C.,** The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2008. **97**: 177-250.
- 6 **Oguro, H., Ding, L. and Morrison, S. J.,** SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 2013. **13**: 102-116.
- 7 **Berger, S. B., Romero, X., Ma, C., Wang, G., Faubion, W. A., Liao, G., Compeer, E., Keszei, M., Rameh, L., Wang, N., Boes, M., Regueiro, J. R., Reinecker, H. C. and Terhorst, C.,** SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol.* **11**: 920-927.
- 8 **Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y.,** SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000. **406**: 893-897.
- 9 **Hsu, E. C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A. A. and Richardson, C. D.,** CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 2001. **279**: 9-21.
- 10 **Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y.,** [The cellular receptor for measles virus: SLAM (CDw 150)]. *Uirusu* 2000. **50**: 289-296.
- 11 **Baorto, D. M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M. L., van der Merwe, A., Lublin, D. M. and Abraham, S. N.,** Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 1997. **389**: 636-639.
- 12 **Li, X. J., Marchal, C. C., Stull, N. D., Stahelin, R. V. and Dinauer, M. C.,** p47phox Phox homology domain regulates plasma membrane but not phagosome neutrophil NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 2010. **285**: 35169-35179.
- 13 **Taura, M., Miyano, K., Minakami, R., Kamakura, S., Takeya, R. and Sumimoto, H.,** A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem J* 2009. **419**: 329-338.

- 14 **Gu, M. X., Fu, Y., Sun, X. L., Ding, Y. Z., Li, C. H., Pang, W., Pan, S. and Zhu, Y.,** Proteomic analysis of endothelial lipid rafts reveals a novel role of statins in antioxidation. *J Proteome Res* 2012. **11**: 2365-2373.
- 15 **Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Cui, Y. and Kuwabara, M.,** Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 2000. **467**: 253-258.
- 16 **Zhou, Y. B., Feng, X., Wang, L. N., Du, J. Q., Zhou, Y. Y., Yu, H. P., Zang, Y., Li, J. Y. and Li, J.,** LGH00031, a novel ortho-quinonoid inhibitor of cell division cycle 25B, inhibits human cancer cells via ROS generation. *Acta Pharmacol Sin* 2009. **30**: 1359-1368.
- 17 **Markvicheva, K. N., Gorokhovatskii, A., Mishina, N. M., Mudrik, N. N., Vinokurov, L. M., Luk'ianov, S. A. and Belousov, V. V.,** [Signaling function of phagocytic NADPH oxidase: activation of MAP kinase cascades in phagocytosis]. *Bioorg Khim* 2010. **36**: 133-138.
- 18 **Elsori, D. H., Yakubenko, V. P., Roome, T., Thiagarajan, P. S., Bhattacharjee, A., Yadav, S. P. and Cathcart, M. K.,** Protein kinase Cdelta is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes. *J Leukoc Biol* 2011. **90**: 599-611.
- 19 **Chen, Q., Powell, D. W., Rane, M. J., Singh, S., Butt, W., Klein, J. B. and McLeish, K. R.,** Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol* 2003. **170**: 5302-5308.
- 20 **Kingsbury, G. A., Feeney, L. A., Nong, Y., Calandra, S. A., Murphy, C. J., Corcoran, J. M., Wang, Y., Prabhu Das, M. R., Busfield, S. J., Fraser, C. C. and Villeval, J. L.,** Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol* 2001. **166**: 5675-5680.
- 21 **Nathan, C.,** Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol* 2008. **9**: 695-698.
- 22 **Kaufmann, S. H.,** Elie Metchnikoff's and Paul Ehrlich's impact on infection biology. *Microbes Infect* 2008. **10**: 1417-1419.
- 23 **Sabin, F. R. and Doan, C. A.,** The Relation of Monocytes and Clasmatocytes to Early Infection in Rabbits with Bovine Tubercle Bacilli. *J Exp Med* 1927. **46**: 627-644.
- 24 **van Furth, R. and Cohn, Z. A.,** The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968. **128**: 415-435.
- 25 **Auffray, C., Sieweke, M. H. and Geissmann, F.,** Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009. **27**: 669-692.
- 26 **Gordon, S. and Taylor, P. R.,** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 953-964.
- 27 **Shi, C. and Pamer, E. G.,** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011. **11**: 762-774.

- 28 **Geissmann, F., Jung, S. and Littman, D. R.**, Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003. **19**: 71-82.
- 29 **Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M. and Pamer, E. G.**, Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008. **26**: 421-452.
- 30 **Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. and Bravo, R.**, Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 1997. **186**: 1757-1762.
- 31 **Kuziel, W. A., Morgan, S. J., Dawson, T. C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K. and Maeda, N.**, Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. **94**: 12053-12058.
- 32 **Si, Y., Tsou, C. L., Croft, K. and Charo, I. F.**, CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* 2010. **120**: 1192-1203.
- 33 **Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G. and Geissmann, F.**, Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007. **317**: 666-670.
- 34 **Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R. and Pittet, M. J.**, The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007. **204**: 3037-3047.
- 35 **Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M. and Mosser, D. M.**, Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 2007. **82**: 244-252.
- 36 **Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J., Ziegler-Heitbrock, L. and Randolph, G. J.**, Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010. **115**: e10-19.
- 37 **Ziegler-Heitbrock, L.**, The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007. **81**: 584-592.
- 38 **Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T. and Ziegler-Heitbrock, L.**, The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002. **168**: 3536-3542.
- 39 **Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C. and Geissmann, F.**, Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010. **33**: 375-386.

- 40 **Yasaka, T., Mantich, N. M., Boxer, L. A. and Baehner, R. L.,** Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J Immunol* 1981. **127:** 1515-1518.
- 41 **Figdor, C. G., Bont, W. S., Touw, I., de Roos, J., Roosnek, E. E. and de Vries, J. E.,** Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood* 1982. **60:** 46-53.
- 42 **Akiyama, Y., Miller, P. J., Thurman, G. B., Neubauer, R. H., Oliver, C., Favilla, T., Beman, J. A., Oldham, R. K. and Stevenson, H. C.,** Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest* 1983. **72:** 1093-1105.
- 43 **Schreiber, A. D., Kelley, M., Dziarski, A. and Levinson, A. I.,** Human monocyte functional heterogeneity: monocyte fractionation by discontinuous albumin gradient centrifugation. *Immunology* 1983. **49:** 231-238.
- 44 **Weiner, R. S. and Mason, R. R.,** Subfractionation of human blood monocyte subsets with Percoll. *Exp Hematol* 1984. **12:** 800-804.
- 45 **Akiyama, Y., Stevenson, G. W., Schlick, E., Matsushima, K., Miller, P. J. and Stevenson, H. C.,** Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *J Leukoc Biol* 1985. **37:** 519-530.
- 46 **Elias, J. A., Chien, P., Gustilo, K. M. and Schreiber, A. D.,** Differential interleukin-1 elaboration by density-defined human monocyte subpopulations. *Blood* 1985. **66:** 298-301.
- 47 **Esa, A. H., Noga, S. J., Donnenberg, A. D. and Hess, A. D.,** Immunological heterogeneity of human monocyte subsets prepared by counterflow centrifugation elutriation. *Immunology* 1986. **59:** 95-99.
- 48 **Passlick, B., Flieger, D. and Ziegler-Heitbrock, H. W.,** Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989. **74:** 2527-2534.
- 49 **Ziegler-Heitbrock, H. W., Passlick, B. and Flieger, D.,** The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 1988. **7:** 521-527.
- 50 **Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B. and Pforte, A.,** The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993. **23:** 2053-2058.
- 51 **Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. and Ziegler-Heitbrock, H. W.,** Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996. **87:** 373-377.
- 52 **Sanchez-Torres, C., Garcia-Romo, G. S., Cornejo-Cortes, M. A., Rivas-Carvalho, A. and Sanchez-Schmitz, G.,** CD16+ and CD16- human blood

- monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol* 2001. **13**: 1571-1581.
- 53 **Randolph, G. J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R. M. and Schakel, K.,** The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002. **196**: 517-527.
- 54 **Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinikas, F. W. and Gabuzda, D.,** Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 2003. **197**: 1701-1707.
- 55 **Horelt, A., Belge, K. U., Steppich, B., Prinz, J. and Ziegler-Heitbrock, L.,** The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 2002. **32**: 1319-1327.
- 56 **Fingerle-Rowson, G., Auers, J., Kreuzer, E., Fraunberger, P., Blumenstein, M. and Ziegler-Heitbrock, L. H.,** Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation* 1998. **22**: 367-379.
- 57 **Mizuno, K., Toma, T., Tsukiji, H., Okamoto, H., Yamazaki, H., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S. and Yachie, A.,** Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005. **142**: 461-470.
- 58 **Noel, J. G., Osterburg, A., Wang, Q., Guo, X., Byrum, D., Schwemberger, S., Goetzman, H., Caldwell, C. C. and Ogle, C. K.,** Thermal injury elevates the inflammatory monocyte subpopulation in multiple compartments. *Shock* 2007. **28**: 684-693.
- 59 **Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J., Ong, S. M., Dang, T. M. and Wong, S. C.,** The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012. **53**: 41-57.
- 60 **Grage-Griebenow, E., Flad, H. D. and Ernst, M.,** Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001. **69**: 11-20.
- 61 **Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M. and Lutz, M. B.,** Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010. **116**: e74-80.
- 62 **Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P. and Wong, S. C.,** Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011. **118**: e16-31.
- 63 **Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D. and Heine, G. H.,** SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011. **118**: e50-61.
- 64 **Kim, W. K., Sun, Y., Do, H., Autissier, P., Halpern, E. F., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Burdo, T. H., McGrath, M. S. and Williams, K.,** Monocyte

- heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol* 2010. **87**: 557-567.
- 65 **Wildgruber, M., Lee, H., Chudnovskiy, A., Yoon, T. J., Etzrodt, M., Pittet, M. J., Nahrendorf, M., Croce, K., Libby, P., Weissleder, R. and Swirski, F. K.**, Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors. *PLoS One* 2009. **4**: e5663.
- 66 **Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Kataiwa, H., Nakamura, N., Hirata, K., Tanaka, A. and Akasaka, T.**, Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009. **54**: 130-138.
- 67 **Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. C., Haddad, E. K. and Sekaly, R. P.**, Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. **16**: 452-459.
- 68 **Andreu, P., Johansson, M., Affara, N. I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D. G., Naldini, L., de Visser, K. E., De Palma, M. and Coussens, L. M.**, FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 2010. **17**: 121-134.
- 69 **Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L. H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S. and Kwakkenbos, M. J.**, EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 2797-2802.
- 70 **McGaha, T. L., Chen, Y., Ravishankar, B., van Rooijen, N. and Karlsson, M. C.**, Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood* 2011. **117**: 5403-5412.
- 71 **Iannacone, M., Moseman, E. A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S. E., Whelan, S. P., Guidotti, L. G. and von Andrian, U. H.**, Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* 2010. **465**: 1079-1083.
- 72 **Junt, T., Moseman, E. A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P. A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S. E., Shayakhmetov, D. M., Di Paolo, N. C., van Rooijen, N., Mempel, T. R., Whelan, S. P. and von Andrian, U. H.**, Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 2007. **450**: 110-114.
- 73 **Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M. and Randolph, G. J.**, Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2010. **10**: 453-460.

- 74 **Murray, P. J. and Wynn, T. A.**, Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 2011. **89**: 557-563.
- 75 **Murray, P. J. and Wynn, T. A.**, Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. **89**: 557-563.
- 76 **Sica, A. and Mantovani, A.**, Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. **122**: 787-795.
- 77 **Alfano, M., Graziano, F., Genovese, L. and Poli, G.**, Macrophage polarization at the crossroad between HIV-1 infection and cancer development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **33**: 1145-1152.
- 78 **Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Clynes, R. and Mosser, D. M.**, Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 1997. **185**: 1977-1985.
- 79 **Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P. and Mosser, D. M.**, Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J Exp Med* 1998. **188**: 217-222.
- 80 **Mosser, D. M. and Edwards, J. P.**, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008. **8**: 958-969.
- 81 **Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B. and Lee, C. H.**, Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARδ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2008. **7**: 485-495.
- 82 **Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, Z. S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R. M., Barak, Y., Schwabe, J. and Nagy, L.**, STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARγ-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity*. **33**: 699-712.
- 83 **Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., Robinson, S. C. and Balkwill, F. R.**, "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-κB. *J Exp Med* 2008. **205**: 1261-1268.
- 84 **Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J. N., Wynn, T. A. and Murray, P. J.**, Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 2001. **166**: 2173-2177.
- 85 **Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. and Suzuki, K.**, Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* 2010. **16**: 105-118.
- 86 **Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D. and Allen, J. E.**, Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol* 2009. **182**: 3084-3094.

- 87 **Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K. and Suttles, J.,** Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005. **175**: 342-349.
- 88 **Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Terhorst, C. and Morrison, S. J.,** SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005. **121**: 1109-1121.
- 89 **Cannons, J. L., Tangye, S. G. and Schwartzberg, P. L.,** SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol* 2011. **29**: 665-705.
- 90 **Nichols, K. E., Ma, C. S., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L. and Tangye, S. G.,** Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 2005. **203**: 180-199.
- 91 **Tatsuo, H., Ono, N. and Yanagi, Y.,** Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 2001. **75**: 5842-5850.
- 92 **Ma, C. S., Nichols, K. E. and Tangye, S. G.,** Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 2007. **25**: 337-379.
- 93 **Moran, M. and Miceli, M. C.,** Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 1998. **9**: 787-796.
- 94 **Regier, D. S., Greene, D. G., Sergeant, S., Jesaitis, A. J. and McPhail, L. C.,** Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem* 2000. **275**: 28406-28412.
- 95 **Watzl, C. and Long, E. O.,** Natural killer cell inhibitory receptors block actin cytoskeleton-dependent recruitment of 2B4 (CD244) to lipid rafts. *J Exp Med* 2003. **197**: 77-85.
- 96 **Nakajima, H., Cella, M., Langen, H., Friedlein, A. and Colonna, M.,** Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 1676-1683.
- 97 **Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., Landi, E., Biassoni, R., Notarangelo, L. D., Moretta, L. and Moretta, A.,** NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* 2001. **194**: 235-246.
- 98 **Bouchon, A., Cella, M., Grierson, H. L., Cohen, J. I. and Colonna, M.,** Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 2001. **167**: 5517-5521.
- 99 **Dong, Z., Cruz-Munoz, M. E., Zhong, M. C., Chen, R., Latour, S. and Veillette, A.,** Essential function for SAP family adaptors in the surveillance

- of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol* 2009. **10**: 973-980.
- 100 **Lee, K. M., McNerney, M. E., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Schatzle, J. D., Bennett, M. and Kumar, V.,** 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 2004. **199**: 1245-1254.
- 101 **Mooney, J. M., Klem, J., Wulfing, C., Mijares, L. A., Schwartzberg, P. L., Bennett, M. and Schatzle, J. D.,** The murine NK receptor 2B4 (CD244) exhibits inhibitory function independent of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein expression. *J Immunol* 2004. **173**: 3953-3961.
- 102 **Bloch-Queyrat, C., Fondaneche, M. C., Chen, R., Yin, L., Relouzat, F., Veillette, A., Fischer, A. and Latour, S.,** Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* 2005. **202**: 181-192.
- 103 **Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., Prefumo, F., Fulcheri, E., Venturini, P. L., Costa, M., Moretta, A., Moretta, L. and Mingari, M. C.,** Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 2006. **108**: 4078-4085.
- 104 **Sivori, S., Falco, M., Marcenaro, E., Parolini, S., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A.,** Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 4526-4531.
- 105 **Cruz-Munoz, M. E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S. and Veillette, A.,** Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat Immunol* 2009. **10**: 297-305.
- 106 **Garni-Wagner, B. A., Purohit, A., Mathew, P. A., Bennett, M. and Kumar, V.,** A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1993. **151**: 60-70.
- 107 **Sidorenko, S. P. and Clark, E. A.,** Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* 1993. **151**: 4614-4624.
- 108 **Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E. and Aversa, G.,** A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995. **376**: 260-263.
- 109 **Castro, A. G., Hauser, T. M., Cocks, B. G., Abrams, J., Zurawski, S., Churakova, T., Zonin, F., Robinson, D., Tangye, S. G., Aversa, G., Nichols, K. E., de Vries, J. E., Lanier, L. L. and O'Garra, A.,** Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1999. **163**: 5860-5870.

- 110 **Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., Gullo, C., Clarke, K., Sosa, M. R., Sharpe, A. H. and Terhorst, C.,** The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* 2004. **199**: 1255-1264.
- 111 **Henning, G., Kraft, M. S., Derfuss, T., Pirzer, R., de Saint-Basile, G., Aversa, G., Fleckenstein, B. and Meinl, E.,** Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001. **31**: 2741-2750.
- 112 **Rethi, B., Gogolak, P., Szatmari, I., Veres, A., Erdos, E., Nagy, L., Rajnavolgyi, E., Terhorst, C. and Lanyi, A.,** SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2006. **107**: 2821-2829.
- 113 **Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. and Modlin, R. L.,** Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 2001. **167**: 3174-3181.
- 114 **Veillette, A.,** SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010. **2**: a002469.
- 115 **Aversa, G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Cocks, B. G. and de Vries, J. E.,** Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1997. **158**: 4036-4044.
- 116 **Howie, D., Okamoto, S., Rietdijk, S., Clarke, K., Wang, N., Gullo, C., Bruggeman, J. P., Manning, S., Coyle, A. J., Greenfield, E., Kuchroo, V. and Terhorst, C.,** The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 2002. **100**: 2899-2907.
- 117 **Punnonen, J., Cocks, B. G., Carballido, J. M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G. and de Vries, J. E.,** Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 1997. **185**: 993-1004.
- 118 **Wandstrat, A. E., Nguyen, C., Limaye, N., Chan, A. Y., Subramanian, S., Tian, X. H., Yim, Y. S., Pertsemlidis, A., Garner, H. R., Jr., Morel, L. and Wakeland, E. K.,** Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* 2004. **21**: 769-780.
- 119 **Kumar, K. R., Li, L., Yan, M., Bhaskarabhatla, M., Mobley, A. B., Nguyen, C., Mooney, J. M., Schatzle, J. D., Wakeland, E. K. and Mohan, C.,** Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108. *Science* 2006. **312**: 1665-1669.
- 120 **Jordan, M. A., Fletcher, J. M., Pellicci, D. and Baxter, A. G.,** Slamf1, the NKT cell control gene Nkt1. *J Immunol* 2007. **178**: 1618-1627.

- 121 **Suzuki, A., Yamada, R., Kochi, Y., Sawada, T., Okada, Y., Matsuda, K., Kamatani, Y., Mori, M., Shimane, K., Hirabayashi, Y., Takahashi, A., Tsunoda, T., Miyatake, A., Kubo, M., Kamatani, N., Nakamura, Y. and Yamamoto, K.,** Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet* 2008. **40**: 1224-1229.
- 122 **Cunninghame Graham, D. S., Vyse, T. J., Fortin, P. R., Montpetit, A., Cai, Y. C., Lim, S., McKenzie, T., Farwell, L., Rhodes, B., Chad, L., Hudson, T. J., Sharpe, A., Terhorst, C., Greenwood, C. M., Wither, J. and Rioux, J. D.,** Association of LY9 in UK and Canadian SLE families. *Genes Immun* 2008. **9**: 93-102.
- 123 **Davidson, D., Shi, X., Zhang, S., Wang, H., Nemer, M., Ono, N., Ohno, S., Yanagi, Y. and Veillette, A.,** Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 2004. **21**: 707-717.
- 124 **Vaidya, S. V., Stepp, S. E., McNerney, M. E., Lee, J. K., Bennett, M., Lee, K. M., Stewart, C. L., Kumar, V. and Mathew, P. A.,** Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells. *J Immunol* 2005. **174**: 800-807.
- 125 **McNerney, M. E., Guzior, D. and Kumar, V.,** 2B4 (CD244)-CD48 interactions provide a novel MHC class I-independent system for NK-cell self-tolerance in mice. *Blood* 2005. **106**: 1337-1340.
- 126 **Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D. G., Mamchak, A. A., Terhorst, C. and Bendelac, A.,** Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 2007. **27**: 751-762.
- 127 **Graham, D. B., Bell, M. P., McCausland, M. M., Huntoon, C. J., van Deursen, J., Faubion, W. A., Crotty, S. and McKean, D. J.,** Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol* 2006. **176**: 291-300.
- 128 **Nanda, N., Andre, P., Bao, M., Clauser, K., Deguzman, F., Howie, D., Conley, P. B., Terhorst, C. and Phillips, D. R.,** Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* 2005. **106**: 3028-3034.
- 129 **Warren-Perry, M. G., Manley, S. E., Ostrega, D., Polonsky, K., Mussett, S., Brown, P. and Turner, R. C.,** A novel point mutation in the insulin gene giving rise to hyperproinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1997. **82**: 1629-1631.
- 130 **Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. and Levings, M. K.,** Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006. **212**: 28-50.

- 131 **McBride, J. M., Jung, T., de Vries, J. E. and Aversa, G.,** IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 2002. **215**: 162-172.
- 132 **Velten, F. W., Duperrier, K., Bohlender, J., Metharom, P. and Goerdts, S.,** A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur J Immunol* 2004. **34**: 2800-2811.
- 133 **Howie, D., Laroux, F. S., Morra, M., Satoskar, A. R., Rosas, L. E., Faubion, W. A., Julien, A., Rietdijk, S., Coyle, A. J., Fraser, C. and Terhorst, C.,** Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J Immunol* 2005. **174**: 5931-5935.
- 134 **Sintes, J., Romero, X., de Salort, J., Terhorst, C. and Engel, P.,** Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *J Leukoc Biol.* **88**: 687-697.
- 135 **Munitz, A., Bachelet, I., Eliashar, R., Khodoun, M., Finkelman, F. D., Rothenberg, M. E. and Levi-Schaffer, F.,** CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils. *J Immunol* 2006. **177**: 77-83.
- 136 **Munitz, A., Bachelet, I., Finkelman, F. D., Rothenberg, M. E. and Levi-Schaffer, F.,** CD48 is critically involved in allergic eosinophilic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007. **175**: 911-918.
- 137 **Oliver-Vila, I., Saborit-Villarroya, I., Engel, P. and Martin, M.,** The leukocyte receptor CD84 inhibits Fc epsilon RI-mediated signaling through homophilic interaction in transfected RBL-2H3 cells. *Mol Immunol* 2008. **45**: 2138-2149.
- 138 **Matesanz-Isabel, J., Sintes, J., Llinas, L., de Salort, J., Lazaro, A. and Engel, P.,** New B-cell CD molecules. *Immunol Lett* 2011. **134**: 104-112.
- 139 **Abadia-Molina, A. C., Ji, H., Faubion, W. A., Julien, A., Latchman, Y., Yagita, H., Sharpe, A., Bhan, A. K. and Terhorst, C.,** CD48 controls T-cell and antigen-presenting cell functions in experimental colitis. *Gastroenterology* 2006. **130**: 424-434.
- 140 **Lambeth, J. D., Cheng, G., Arnold, R. S. and Edens, W. A.,** Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci* 2000. **25**: 459-461.
- 141 **Zeng, J. and Fenna, R. E.,** X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol* 1992. **226**: 185-207.
- 142 **Segal, A. W.,** How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005. **23**: 197-223.
- 143 **Nathan, C.,** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006. **6**: 173-182.
- 144 **Babior, B. M.,** NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999. **93**: 1464-1476.
- 145 **El-Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidalo, M. A. and Elbim, C.,** Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005. **53**: 199-206.

- 146 **Meischl, C. and Roos, D.**, The molecular basis of chronic granulomatous disease. *Springer Semin Immunopathol* 1998. **19**: 417-434.
- 147 **Kannengiesser, C., Gerard, B., El Benna, J., Henri, D., Kroviarski, Y., Chollet-Martin, S., Gougerot-Pocidallo, M. A., Elbim, C. and Grandchamp, B.**, Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum Mutat* 2008. **29**: E132-E149.
- 148 **Chanock, S. J., el Benna, J., Smith, R. M. and Babior, B. M.**, The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994. **269**: 24519-24522.
- 149 **Groemping, Y. and Rittinger, K.**, Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005. **386**: 401-416.
- 150 **Vignais, P. V.**, The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002. **59**: 1428-1459.
- 151 **el Benna, J., Faust, L. P. and Babior, B. M.**, The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 1994. **269**: 23431-23436.
- 152 **Faust, L. R., el Benna, J., Babior, B. M. and Chanock, S. J.**, The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* 1995. **96**: 1499-1505.
- 153 **Quinn, M. T. and Gauss, K. A.**, Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 2004. **76**: 760-781.
- 154 **Vignais, P. V.**, The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002. **59**: 1428-1459.
- 155 **Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H.**, Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003. **100**: 4474-4479.
- 156 **Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J. and Rittinger, K.**, Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003. **113**: 343-355.
- 157 **Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H. and Kohda, D.**, Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol* 2001. **8**: 526-530.
- 158 **Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A. and Lambeth, J. D.**, Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 1998. **273**: 16663-16668.
- 159 **Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H. and Lambeth, J. D.**, The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 1999. **274**: 22999-23005.

- 160 **Crossland, D. S., Furness, J. C., Abu-Harb, M., Sadagopan, S. N. and Wren, C.,** Variability of four limb blood pressure in normal neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004. **89**: F325-327.
- 161 **Liu, W. S. and Heckman, C. A.,** The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998. **10**: 529-542.
- 162 **Inanami, O., Johnson, J. L., McAdara, J. K., Benna, J. E., Faust, L. R., Newburger, P. E. and Babior, B. M.,** Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J Biol Chem* 1998. **273**: 9539-9543.
- 163 **Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H. and Kuwabara, M.,** Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 2004. **316**: 720-730.
- 164 **Waki, K., Inanami, O., Yamamori, T. and Kuwabara, M.,** Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in the activation of NADPH oxidase induced by FMLP receptor but not by complement receptor 3 in rat neutrophils. *Free Radic Res* 2003. **37**: 665-671.
- 165 **Dang, P. M., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J. and Perianin, A.,** Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 2001. **166**: 1206-1213.
- 166 **Ago, T., Nunoi, H., Ito, T. and Sumimoto, H.,** Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem* 1999. **274**: 33644-33653.
- 167 **Raad, H., Paclet, M. H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidallo, M. A., Dang, P. M. and El-Benna, J.,** Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *Faseb J* 2009. **23**: 1011-1022.
- 168 **Fontayne, A., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A. and El-Benna, J.,** Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 2002. **41**: 7743-7750.
- 169 **El Benna, J., Faust, R. P., Johnson, J. L. and Babior, B. M.,** Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996. **271**: 6374-6378.
- 170 **Kramer, I. M., van der Bend, R. L., Verhoeven, A. J. and Roos, D.,** The 47-kDa protein involved in the NADPH:O₂ oxidoreductase activity of human

- neutrophils is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase without induction of a respiratory burst. *Biochim Biophys Acta* 1988. **971**: 189-196.
- 171 **El Benna, J., Han, J., Park, J. W., Schmid, E., Ulevitch, R. J. and Babior, B. M.**, Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* 1996. **334**: 395-400.
- 172 **Martyn, K. D., Kim, M. J., Quinn, M. T., Dinauer, M. C. and Knaus, U. G.**, p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Blood* 2005. **106**: 3962-3969.
- 173 **Korchak, H. M. and Kilpatrick, L. E.**, Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells. *J Biol Chem* 2001. **276**: 8910-8917.
- 174 **Dekker, L. V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J. and Segal, A. W.**, Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* 2000. **347 Pt 1**: 285-289.
- 175 **Bey, E. A., Xu, B., Bhattacharjee, A., Oldfield, C. M., Zhao, X., Li, Q., Subbulakshmi, V., Feldman, G. M., Wientjes, F. B. and Cathcart, M. K.**, Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *J Immunol* 2004. **173**: 5730-5738.
- 176 **Brown, G. E., Stewart, M. Q., Liu, H., Ha, V. L. and Yaffe, M. B.**, A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol Cell* 2003. **11**: 35-47.
- 177 **Cheng, N., He, R., Tian, J., Dinauer, M. C. and Ye, R. D.**, A critical role of protein kinase C delta activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47(phox) and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 2007. **179**: 7720-7728.
- 178 **Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M. A. and El-Benna, J.**, The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000. **165**: 5238-5244.
- 179 **Park, H. S., Lee, S. M., Lee, J. H., Kim, Y. S., Bae, Y. S. and Park, J. W.**, Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem J* 2001. **358**: 783-790.
- 180 **Wrann, C. D., Winter, S. W., Barkhausen, T., Hildebrand, F., Krettek, C. and Riedemann, N. C.**, Distinct involvement of p38-, ERK1/2 and PKC signaling pathways in C5a-mediated priming of oxidative burst in phagocytic cells. *Cell Immunol* 2007. **245**: 63-69.

- 181 **Cathcart, M. K.**, Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004. **24**: 23-28.
- 182 **Brune, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., von Knethen, A. and Weigert, A.**, Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 2013. **19**: 595-637.
- 183 **Forman, H. J. and Torres, M.**, Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 2001. **51**: 365-371.
- 184 **Yamamori, T., Inanami, O., Sumimoto, H., Akasaki, T., Nagahata, H. and Kuwabara, M.**, Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2002. **293**: 1571-1578.
- 185 **Wang, Y., Zeigler, M. M., Lam, G. K., Hunter, M. G., Eubank, T. D., Khramtsov, V. V., Tridandapani, S., Sen, C. K. and Marsh, C. B.**, The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007. **36**: 68-77.
- 186 **Dingayan, L. P.**, p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and NADPH Oxidase (NOX) are cytoprotective determinants in the trophozoite-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 2011. **272**: 25-32.
- 187 **Kasahara, E., Sekiyama, A., Hori, M., Hara, K., Takahashi, N., Konishi, M., Sato, E. F., Matsumoto, S., Okamura, H. and Inoue, M.**, Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. *FEBS Lett* 2011. **585**: 2263-2268.
- 188 **Guha, M. and Mackman, N.**, LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001. **13**: 85-94.
- 189 **Check, J., Byrd, C. L., Menio, J., Rippe, R. A., Hines, I. N. and Wheeler, M. D.**, Src kinase participates in LPS-induced activation of NADPH oxidase. *Mol Immunol* 2010. **47**: 756-762.
- 190 **Ngkelo, A., Meja, K., Yeadon, M., Adcock, I. and Kirkham, P. A.**, LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gialpha dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm (Lond)* 2012. **9**: 1.
- 191 **Dang, P. M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O. N., Gougerot-Pocidallo, M. A. and El-Benna, J.**, A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006. **116**: 2033-2043.
- 192 **Brown, G. E., Stewart, M. Q., Bissonnette, S. A., Elia, A. E., Wilker, E. and Yaffe, M. B.**, Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004. **279**: 27059-27068.

- 193 **Wennerberg, K. and Der, C. J.**, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004. **117**: 1301-1312.
- 194 **Bokoch, G. M.**, Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol* 2005. **15**: 163-171.
- 195 **Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G. and Segal, A. W.**, Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991. **353**: 668-670.
- 196 **Gregg, D., Rauscher, F. M. and Goldschmidt-Clermont, P. J.**, Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003. **285**: C723-734.
- 197 **Nishida, M., Tanabe, S., Maruyama, Y., Mangmool, S., Urayama, K., Nagamatsu, Y., Takagahara, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Kobayashi, H., Sato, Y., Kawanishi, T., Inoue, R., Nagao, T. and Kurose, H.**, G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2005. **280**: 18434-18441.
- 198 **Choi, J. A., Park, M. T., Kang, C. M., Um, H. D., Bae, S., Lee, K. H., Kim, T. H., Kim, J. H., Cho, C. K., Lee, Y. S., Chung, H. Y. and Lee, S. J.**, Opposite effects of Ha-Ras and Ki-Ras on radiation-induced apoptosis via differential activation of PI3K/Akt and Rac/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Oncogene* 2004. **23**: 9-20.
- 199 **Palmer, S. H., Servant, C. T., Maguire, J., Machan, S., Parish, E. N. and Cross, M. J.**, Surgical reconstruction of severe patellofemoral maltracking. *Clin Orthop Relat Res* 2004: 144-148.
- 200 **Chomczynski, P. and Sacchi, N.**, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. **162**: 156-159.
- 201 **Bradford, M. M.**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976. **72**: 248-254.
- 202 **Kricka, L. J., Voyta, J. C. and Bronstein, I.**, Chemiluminescent methods for detecting and quantitating enzyme activity. *Methods Enzymol* 2000. **305**: 370-390.
- 203 **Berger, S. B., Romero, X., Ma, C., Wang, G., Faubion, W. A., Liao, G., Compeer, E., Keszei, M., Rameh, L., Wang, N., Boes, M., Regueiro, J. R., Reinecker, H. C. and Terhorst, C.**, SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol* 2010. **11**: 920-927.
- 204 **Heng, T. S. and Painter, M. W.**, The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* 2008. **9**: 1091-1094.

- 205 **Forman, H. J. and Torres, M.**, Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002. **166**: S4-8.
- 206 **Park, J. B.**, Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* 2003. **35**: 325-335.
- 207 **El-Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidalo, M. A., Marie, J. C. and Braut-Boucher, F.**, p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 2009. **41**: 217-225.
- 208 **Bertram, A. and Ley, K.**, Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011. **59**: 79-87.
- 209 **Leitges, M.**, Functional PKC in vivo analysis using deficient mouse models. *Biochem Soc Trans* 2007. **35**: 1018-1020.
- 210 **Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F. J., Songyang, Z. and Cantley, L. C.**, Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 1997. **272**: 952-960.
- 211 **Laroux, F. S., Romero, X., Wetzler, L., Engel, P. and Terhorst, C.**, Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J Immunol* 2005. **175**: 5596-5600.
- 212 **Shibasaki, M.**, [Phorbols: chemical synthesis and chemical biology]. *Yakugaku Zasshi* 2000. **120**: 76-90.
- 213 **Lal, A. S., Clifton, A. D., Rouse, J., Segal, A. W. and Cohen, P.**, Activation of the neutrophil NADPH oxidase is inhibited by SB 203580, a specific inhibitor of SAPK2/p38. *Biochem Biophys Res Commun* 1999. **259**: 465-470.
- 214 **Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T. and Stephens, L. R.**, P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* 2002. **108**: 809-821.
- 215 **Qian, F., Deng, J., Cheng, N., Welch, E. J., Zhang, Y., Malik, A. B., Flavell, R. A., Dong, C. and Ye, R. D.**, A non-redundant role for MKP5 in limiting ROS production and preventing LPS-induced vascular injury. *EMBO J* 2009. **28**: 2896-2907.
- 216 **Hornig, T., Barton, G. M. and Medzhitov, R.**, TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001. **2**: 835-841.
- 217 **Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H.**, ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 2005. **6**: 587-592.
- 218 **Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Ugolev, Y., Molshanski-Mor, S., Nakash, Y., Dahan, I., Alloul, N., Gorzalczany, Y., Sarfstein, R., Hirshberg, M. and Pick, E.**, Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric

- constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J Leukoc Biol* 2006. **79**: 881-895.
- 219 **Jutras, I., Houde, M., Currier, N., Boulais, J., Duclos, S., LaBoissiere, S., Bonneil, E., Kearney, P., Thibault, P., Paramithiotis, E., Hugo, P. and Desjardins, M.**, Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* 2008. **7**: 697-715.
- 220 **Etienne-Manneville, S. and Hall, A.**, Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002. **420**: 629-635.
- 221 **Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A. and Segal, A. W.**, Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 1994. **298 Pt 3**: 585-591.
- 222 **Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T. and Bokoch, G. M.**, Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 1991. **254**: 1512-1515.
- 223 **Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A. and Broek, D.**, Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 1998. **279**: 558-560.
- 224 **Ridley, A. J.**, Regulation of macrophage adhesion and migration by Rho GTP-binding proteins. *J Microsc* 2008. **231**: 518-523.
- 225 **Akasaki, T., Koga, H. and Sumimoto, H.**, Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. *J Biol Chem* 1999. **274**: 18055-18059.
- 226 **Northup, J. K., Smigel, M. D. and Gilman, A. G.**, The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase. Identification by ligand binding. *J Biol Chem* 1982. **257**: 11416-11423.
- 227 **Curnutte, J. T., Kuper, R. and Babior, B. M.**, Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem* 1987. **262**: 6450-6452.
- 228 **Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A. W. and Hall, A.**, Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 1994. **265**: 531-533.
- 229 **Crispin, J. C., Hedrich, C. M. and Tsokos, G. C.**, Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 2013. **9**: 476-484.
- 230 **Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G. and Amigorena, S.**, NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 2006. **126**: 205-218.
- 231 **Yates, R. M., Hermetter, A., Taylor, G. A. and Russell, D. G.**, Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 2007. **8**: 241-250.

- 232 **Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T. and Sumimoto, H.**, The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 2002. **21**: 6312-6320.
- 233 **Bouin, A. P., Grandvaux, N., Vignais, P. V. and Fuchs, A.**, p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* 1998. **273**: 30097-30103.
- 234 **Lapouge, K., Smith, S. J., Groemping, Y. and Rittinger, K.**, Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 2002. **277**: 10121-10128.
- 235 **Okamura, N., Malawista, S. E., Roberts, R. L., Rosen, H., Ochs, H. D., Babior, B. M. and Curnutte, J. T.**, Phosphorylation of the oxidase-related 48K phosphoprotein family in the unusual autosomal cytochrome-negative and X-linked cytochrome-positive types of chronic granulomatous disease. *Blood* 1988. **72**: 811-816.
- 236 **Hua, K. F., Wang, S. H., Dong, W. C., Lin, C. Y., Ho, C. L. and Wu, T. H.**, High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C-alpha/delta and NF-kappaB. *Inflamm Res* 2012. **61**: 1107-1116.
- 237 **Loegering, D. J. and Lennartz, M. R.**, Protein kinase C and toll-like receptor signaling. *Enzyme Res* 2011. **2011**: 537821.
- 238 **Herrera-Velit, P., Knutson, K. L. and Reiner, N. E.**, Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C-zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 1997. **272**: 16445-16452.
- 239 **Pacquelet, S., Johnson, J. L., Ellis, B. A., Brzezinska, A. A., Lane, W. S., Munafo, D. B. and Catz, S. D.**, Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem J* 2007. **403**: 451-461.
- 240 **Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T. and Yoshikai, Y.**, Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000. **165**: 5767-5772.
- 241 **Torres, M. and Forman, H. J.**, Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 2003. **17**: 287-296.
- 242 **Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G. and Pae, H. O.**, Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* 2011. **2011**: 792639.
- 243 **Dang, P. M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M. A. and El Benna, J.**, Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* 2003. **42**: 4520-4526.

- 244 **Werner, E.**, GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 2004. **117**: 143-153.
- 245 **Shin, I., Kim, S., Song, H., Kim, H. R. and Moon, A.**, H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2005. **280**: 14675-14683.
- 246 **Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A. and Feig, L. A.**, Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 2002. **22**: 4073-4085.
- 247 **Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M.**, Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005. **122**: 735-749.
- 248 **Nauseef, W. M.**, Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 2004. **122**: 277-291.
- 249 **Hashim, S., Mukherjee, K., Raje, M., Basu, S. K. and Mukhopadhyay, A.**, Live Salmonella modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* 2000. **275**: 16281-16288.
- 250 **Eswarappa, S. M., Negi, V. D., Chakraborty, S., Chandrasekhar Sagar, B. K. and Chakravorty, D.**, Division of the Salmonella-containing vacuole and depletion of acidic lysosomes in Salmonella-infected host cells are novel strategies of Salmonella enterica to avoid lysosomes. *Infect Immun* 2010. **78**: 68-79.
- 251 **Fujiwara, E., Washi, Y. and Matsuzawa, T.**, Observation of autophagosome maturation in the interferon-gamma-primed and lipopolysaccharide-activated macrophages using a tandem fluorescent tagged LC3. *J Immunol Methods*. **394**: 100-106.
- 252 **Rada, B., Hably, C., Meczner, A., Timar, C., Lakatos, G., Enyedi, P. and Ligeti, E.**, Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* 2008. **30**: 237-253.
- 253 **Mantegazza, A. R., Savina, A., Vermeulen, M., Perez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S. D., Faure, F. and Amigorena, S.**, NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 2008. **112**: 4712-4722.
- 254 **Rybicka, J. M., Balce, D. R., Khan, M. F., Krohn, R. M. and Yates, R. M.**, NADPH oxidase activity controls phagosomal proteolysis in macrophages through modulation of the luminal redox environment of phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. **107**: 10496-10501.
- 255 **Lam, G. Y., Huang, J. and Brumell, J. H.**, The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* 2010. **32**: 415-430.
- 256 **Vlahos, C. J., Matter, W. F., Brown, R. F., Traynor-Kaplan, A. E., Heyworth, P. G., Prossnitz, E. R., Ye, R. D., Marder, P., Schelm, J. A., Rothfuss, K. J. and et al.**, Investigation of neutrophil signal transduction using a specific

- inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 1995. **154**: 2413-2422.
- 257 **Song, G., Ouyang, G. and Bao, S.,** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005. **9**: 59-71.
- 258 **Elishmereni, M. and Levi-Schaffer, F.,** CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2010. **43**: 25-28.
- 259 **Huang, J., Canadien, V., Lam, G. Y., Steinberg, B. E., Dinauer, M. C., Magalhaes, M. A., Glogauer, M., Grinstein, S. and Brumell, J. H.,** Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. **106**: 6226-6231.
- 260 **El-Benna, J., Dang, P. M. and Gougerot-Pocidallo, M. A.,** Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008. **30**: 279-289.
- 261 **Babior, B. M.,** Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984. **64**: 959-966.
- 262 **Babior, B. M.,** Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000. **109**: 33-44.

ANEXO I: Expresión de la proteína inhibidora de apoptosis neuronal, NAIP, en macrófagos y posible intervención de NAIP en las etapas tempranas de la fagocitosis.

INTRODUCCIÓN

Una familia de proteínas que también tiene una función importante en el sistema inmunológico innato de mamíferos es la familia de receptores NLR (*NOD-like receptors/Nucleotide Oligomerization Domain receptors*). Al igual que los TLRs (*Toll-like Receptors*) y considerados como las versiones intracelulares de los TLRs, los NLRs reconocen en el citoplasma patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) tales como la flagelina y lipopolisacáridos. Mientras que los TLRs están localizados en la superficie celular e inician las rutas de señalización en las que intervienen a partir de la membrana plasmática, los NLRs se asocian en el citoplasma con el inflamasoma [1]. En humanos, la familia NLR se compone de 23 miembros, de los cuales todos ellos son biosensores intracelulares que desempeñan un papel fundamental en la inmunidad innata y la inflamación [2, 3].

Uno de los NLRs mejor caracterizados es la proteína inhibidora de apoptosis neuronal NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*), identificado por Roy et al. en 1995 [4], que representa al miembro fundador de la familia de inhibidores de apoptosis IAP en mamíferos [5]. En principio, la delección parcial del gen NAIP fue asociada con la atrofia muscular espinal [4], más adelante la expresión de NAIP ha sido estudiada en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [6], la enfermedad de Parkinson [7], el síndrome de Down [8] y enfermedades de carácter autoinmune como la esclerosis múltiple [9] o la enfermedad de Crohn (comunicación personal de A. MacKenzie, descubridor de NAIP).

En la especie humana, el gen NAIP se encuentra localizado en el cromosoma 5q13.2. Se trata de una región que presenta una elevada variabilidad genética y en la que se han descrito variaciones para el número de copias génicas [10]. Aparte de la versión completa del gen NAIP, en el genoma humano se encuentran anotadas cuatro versiones parcialmente truncadas del gen completo de NAIP. Por otro lado, se han descrito varios transcritos de NAIP, parálogos y nuevas transcripciones que surgen de sitios de inicio de la transcripción tanto internos como aguas arriba. Estos transcritos codifican marcos de lectura abiertos mermados y las proteínas correspondientes se traducen en ciertas líneas celulares y tejidos primarios, en algunos casos, por encima del nivel de NAIP completo. Algunas de estas isoformas de NAIP carecen de sus motivos de unión a caspasas, lo que sugiere que tienen funciones diferentes [11].

El RNA mensajero NM_004536.2 de la versión completa del gen NAIP/BIRC1 está constituido por 17 exones. De éstos, los tres primeros y el último no son traducidos, y los 13 exones restantes codifican una proteína de 1403 amino ácidos (156 kDa). NAIP pertenece tanto a la familia de NLRs como a la familia de IAPs, es único entre los IAPs por ser biosensor de PAMPs [1] y entre los NLRs por sus características antiapoptóticas [12, 13]. Estructuralmente, las proteínas de la familia IAP se caracterizan por la presencia de un dominio BIR (*Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*). NAIP es el único miembro de la familia de proteínas IAP que contiene 3 dominios BIR en tándem en la región N-terminal. El dominio BIR media la interacción proteína-proteína en procesos tan diversos como mitosis, apoptosis, recepción de señales y ubiquitinización. Consta de un motivo de unos 70 aminoácidos tipo *Zinc-finger* que incluye tres residuos de cisteína y un residuo de histidina conservados dentro de las secuencias consenso CX₂CX₁₆HX₆₋₈C. La interacción entre un dominio BIR funcional y los motivos IBMs (*IAP-binding motifs*) de las caspasas ejecutoras -3 y -7, así como de la caspasa iniciadora -9, conduce a la regulación de la apoptosis. Además del dominio BIR, NAIP lleva un dominio NOD seguido de un LRR. El dominio NOD es esencial para la oligomerización de las moléculas que implican la transducción de señales. El dominio LRR está constituido por una serie de repeticiones ricas en leucina con una función autoinhibidora.

Tras el reconocimiento del patógeno se desencadena la activación del inflamasoma, dicha activación se inicia por ligandos bacterianos concretos. La bacteria patógena fagocitada secreta proteínas en el citoplasma de la célula hospedadora que son reconocidas por NAIP. Concretamente, en ratones, NAIP5 y NAIP6 detectan flagelina de las bacterias flageladas *Legionella pneumophila* y *Salmonella typhimurium*, mientras que NAIP2 se une a proteínas de la varilla interna del flagelo como PrgJ de *Salmonella typhimurium* o BsaK, de *Burkholderia Thailandensis* [14, 15], muy recientemente se ha identificado a la proteína NAIP humana y a NAIP1 de ratón como biosensores para proteínas de la aguja, también conocida como inyector, del sistema de secreción tipo tres en bacterias GRAM negativas [16]. La activación de NAIP conduce al reclutamiento de NLRC4 y al ensamblaje de un gran complejo multiproteico denominado inflamasoma que sirve como adaptador para la proteasa caspasa-1, iniciándose una respuesta inmunitaria innata que implica el procesamiento o maduración de proIL-1 β y proIL-18, y que puede dar lugar a piroptosis [17, 18].

OBJETIVOS

- 1.- Estudiar la expresión de NAIP en monocitos y macrófagos.
- 2.- Caracterizar los anticuerpos frente a NAIP comerciales y proporcionados por el laboratorio del Dr. Alex MacKenzie.
- 3.- Determinar si NAIP participa en la formación y/o maduración del fagosoma en el macrófago.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Estimulación de THP-1 con PMA y Raw 264.7 con *Salmonella*.

Las líneas de monocitos (Mo) humanos THP-1 o MΦ de ratón Raw 264.7 se contaron en una cámara de Neuvauer y se distribuyeron $5 \cdot 10^6$ células en placas de cultivo de 10 cm (Falcon). Una vez calculado el número de células necesario se centrifugó el volumen apropiado a 1200 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. En el caso de THP-1, se suspendieron las células en medio RPMI 1620 completado con 0.5 % FBS inactivado (BioWhittaker, Lonza), glutamina (Gibco), penicilina-estreptomina (Gibco), HEPES (Gibco) y piruvato sódico (Gibco) con 10 ng/ml o 20 ng/ml de PMA, o sin PMA en el caso del control, durante 48 h. En el caso de Raw 264.7, se pusieron en contacto con *Salmonella typhimurium* en medio completado sin antibiótico a una proporción 1:50 durante 30 min.

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación correspondiente, se lavó la bacteria o el PMA con PBS dos veces y se aplicó tampón de lisis RIPA (Gibco) o TRIZOL (Reagent Invitrogen™, Life Technologies) según el tipo de análisis.

2.- Extracción de RNA y RT-PCR.

El RNA total se obtuvo a partir de cultivos de células THP-1 y Raw 264.7 usando el método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent Invitrogen™, Life Technologies) de Chomczynski [19]. A continuación, se hizo una retrotranscripción a partir de 1 µg de RNA total con un kit comercial (*Reverse transcription System*, Promega). Más tarde, se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del DNA complementario (cDNA) obtenido amplificando NAIP o los controles endógenos correspondientes usando las secuencias de cebadores adecuados (tabla 1), con las siguientes condiciones: 95 °C, 5 min. seguido de 35 ciclos de amplificación a 95 °C durante 45 s., 43 °C por 1 min. y 30 s., y 72 °C por 2 min. El producto PCR fue teñido con 1 mg/ml de bromuro de etidio (SIGMA-ALDRICH) y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (Lonza) a 100 V durante 25 min. (PowerPac Basic™,

BioRad). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar de 100 pb para el seguimiento del producto amplificado (Bench Top 100 pb DNA ladder, Promega).

Tabla 1 | **Cebadores usados en la RT-PCR de NAIP en THP-1 y Raw 264.7.**

Nombre	Descripción	Región
mNAIP5-F	NAIP ratón, <i>Forward</i>	5'-ctttcacgacatcttggacga-3'
mNAIP5-R	NAIP ratón, <i>Reverse</i>	5'-cacattgacccagagccttg-3'
hNAIP-F	NAIP ratón, <i>Forward</i>	5'-gctcatggataccacaggaga-3'
hNAIP-R	NAIP ratón, <i>Reverse</i>	5'-ctctcagcctgctcttcagat-3'
mHPRT-F	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, Forward</i>	5'-tgacaacttctgtcctcaaca-3'
mHPRT-R	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, Reverse</i>	5'-atgccgtcctttatctagaac-3'
18s-F	RNA ribosomal 18s, <i>Forward</i>	5'-gatatgctcatgtgggttg-3'
18S-R	RNA ribosomal 18s, <i>Reverse</i>	5'-aatcttcttcagtcgctcca-3'

3.- Aislamiento y activación de macrófagos humanos.

Los estudios realizados en Mo procedentes de sangre humana fueron aprobados por el comité de ética en experimentación humana de la Universidad de Granada, referencia 636. Todas las muestras fueron obtenidas de voluntarios sanos previamente informados y con el correspondiente consentimiento.

La sangre del donante fue recogida en tubos con heparina y diluida a partes iguales con PBS. En tubo 15 ml (Falcon), se pusieron 4 ml de Histopaque® 1077 (SIGMA-ALDRICH) precalentado a 37 °C y sobre éste, 10 ml de sangre diluida en PBS (dejando caer por las paredes, evitando la mezcla). A continuación, se centrifugaron a 2.000 rpm a temperatura ambiente y durante 20 min. (centrifuga sin freno). Tras la separación, se obtuvieron distintas fracciones donde los eritrocitos y PMN se depositaron al fondo, a continuación se encontraba la fase de Histopaque®. Sobre ésta se encontraba un anillo blanquecino con las células

mononucleares; linfocitos y Mo, y en la parte superior se hallaba el plasma junto con las plaquetas. Cuidadosamente, se retiró el plasma con una pipeta *pasteur* de plástico, se tomó el anillo celular, y se le realizó un lavado con 10 ml de PBS. Las células mononucleares fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente. El botón de células fue suspendido en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1.620 completo 10 % FBS y cultivado en incubador a 37 °C, 5% CO₂ y un ambiente humificado durante 1 h. Después se realizaron varios lavados con PBS Ca⁺/Mg⁺ atemperado a 37 °C para eliminar las células no adheridas y se despegaron los Mo con 2 ml de tripsina (Gibco). Tras 2-5 min. a 37 °C, la tripsina fue neutralizada con FBS y las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS. Por último, se realizó un conteo con azul trypan (SIGMA-ALDRICH) para conocer el estado de las células y más tarde distribuidas en placas y cultivadas en medio de cultivo RPMI 1.620 completo con un 10 % FBS hasta su uso, en un periodo máximo de 24 - 48 h. Posteriormente se procedió a los distintos estímulos según se indica en cada momento.

4.- Transducción de Hela con NAIP usando adenovirus.

Los adenovirus utilizados en la transducción de células HeLa para la sobre expresión transitoria de la proteína completa de NAIP fueron generados en el laboratorio del Dr. A. MacKenzie. En este caso, las células, cultivadas en medio de cultivo RPMI 1.620 completo con un 10 % FBS en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Falcon), se lavaron con PBS y se añadió 2 ml de medio que contenía los adenovirus a igual relación virus-célula (MOI: 1). Transcurridas 2 h. se añadió 8ml de medio sin partículas adenovirales y se dejó el cultivo hasta la mañana siguiente en la que el medio fue reemplazado por medio fresco. Tras 24 h después de haber retirado los adenovirus se realizaron los extractos de proteína tal y como se indica en el primer apartado de materiales y métodos.

5.- Western Blot.

El cálculo de la cantidad de proteína de los extractos fue determinado mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad) [20]. En cada lectura se usó BSA (Sigma-Aldrich)

para elaborar la curva estándar y el cálculo de las muestras fue determinado a través de una regresión lineal.

Posteriormente, la muestra fue desnaturalizada en un termo-bloque (Digital Dry Bath, Labnet International) a 95 °C durante 5 min. y cargada, en una cantidad equivalente de proteína, en un gel de acrilamida SDS/PAGE 10 %. En gel de bis-acrilamida (Bio-Rad) se usó TEMED (Merk) como iniciador de la polimerización y persulfato amónico como catalizador en un sistema de tampones discontinuos; la primera fase (TRIS-Cl pH 8.8) para la acumulación de las proteínas hasta el frente de migración, y una segunda fase de separación (TRIS-Cl pH 6.8). La electroforesis (Fuente de alimentación y cubeta de BioRad) se llevó a cabo a 140 V, voltaje constante, durante 50 min. en un tampón de migración (25 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, 192 mM glicina (SIGMA-ALDRICH) y agua doble destilada). Se utilizó un marcador de peso molecular estándar para el seguimiento de la migración de proteínas objeto de estudio (ProSieve). La transferencia húmeda a la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) se realizó en un tampón de transferencia (20 mM Tris-HCl, 60 mM glicina, 20 % metanol y agua doble destilada) a 100 V, voltaje constante, durante 90 min. Las membranas fueron incubadas durante 1h. a temperatura ambiente, en agitación, con 10 % leche desnatada en tampón fosfato salino, PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH: 7.4, *tween* 0,05 % (SIGMA-ALDRICH) y agua doble destilada). Tras 3 lavados con PBS-T durante 10 min., las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario, anti NAIP correspondiente (tabla 2) en PBS-T 1 % leche desnatada durante la noche. Como control de carga se usó actina (anti β-actina Ab, Sigma-Aldrich). Al día siguiente, tras 3 lavados con PSS-T por 10 min., las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Anti-mouse/Anti-rabbit conjugate HRP*, GE Healthcare) a una dilución 1/5.000 en PBS-T 1 % leche desnatada.

La detección de las bandas se realizó por un método de quimioluminiscencia [21] usando reactivos comerciales (ECLplus, Amersham, GE Healthcare). Las imágenes fueron recogidas por un sistema de captación de quimioluminiscencia (LAS-4000 mini, Fujifilm). Los niveles de expresión de las distintas proteínas fueron analizados por densitometría, corrigiendo la carga con los niveles de β-actina presentes en la muestra, con el programa informático Multi-Gauge (V3.0, Fujifilm) aplicando una corrección con respecto al control de carga según la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de la Banda} = \frac{\text{Densidad de la muestra relativa al control (M}\Phi \text{ sin activar)}}{\text{Densidad del control de carga relativa al control}}$$

6.- Inmunofluorescencia.

Los diferentes tipos celulares fueron distribuidos en porta-objetos con celdillas (Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover, RS Glass Slide Sterile, Nalge Nunc International) y mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) complementado con 0.5 % FBS inactivado, glutamina, penicilina-estreptomina, HEPES y piruvato sódico a 37 °C y 5 % CO₂ en un incubador humificado. Al siguiente día, tras el correspondiente estímulo en su caso, se realizó un lavado de los pocillos con PBS (Gibco) a 37 °C para eliminar las células no adheridas. Estas células se fijaron con PFA 1 % (SIGMA-ALDRICH), se permeabilizaron con Triton 100X 0,1 % (Paveac) y se bloquearon con una solución de PBS con BSA 2 % (Sigma-Aldrich) y solución con suero de ratón 2 % (BALB/c WT o *SLAMF8*^{-/-}). Las células se incubaron durante 4 h. a temperatura ambiente con el antígeno primario predeterminado a la dilución indicada en la tabla 2, en PBS. Tras lavar con PBS el exceso de anticuerpo, se añadió el anticuerpo secundario marcado con diferentes fluorocromos (Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of anti-rabbit (H+L) de Invitrogen a una dilución 1/1000, y Alexa Fluor 594 F(ab')₂ fragment of anti-mouse (H+L) de Invitrogen a una dilución 1/1000 durante 1 h. a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas con medio de montaje (*Vectashield*, *Vector Laboratories*) que contiene DAPI, y más tarde visualizadas por microscopía confocal (microscopio de fluorescencia LEICA DM5500B).

Tabla 2 | Anticuerpo frente a NAIP usados en la inmunodetección y WB.

Anicuerpo	Procedencia	Tipo	Antígeno	Dilución
Anti NAIP-J2	Dr. MacKenzie	Policlonal conejo	--	1/50
Anti NAIP-2857	Dr. MacKenzie	Monoclonal ratón	C-terminal	Sobrenadante Hibridoma
Anti NAIP-2860	Dr. MacKenzie	Monoclonal ratón	N-terminal	1/300
Anti NAIP-P16 (Sc-11059)	Santa cruz	Policlonal conejo	N-terminal	1/250
Anti NAIP-G20 (Sc-11060)	Santa cruz	Policlonal conejo	C-terminal	1/250
Anti NAIP-C13 (ab25968)	Abcam	Policlonal conejo	C-Terminal	1/250
Anti NAIP-506 (ab2549)	Abcam	Policlonal conejo	N-Terminal	1/250

7.- Obtención de extractos totales, nucleares y mitocondriales.

El cultivo celular, un total de $10 \cdot 10^6$ células HeLa o THP-1, se lavó con PBS frío y se añadió tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich, R0278-50ML) con 10 % de un cóctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Se incubó durante, al menos, 30 min. a 4 °C. Los extractos de las células lisadas se colectaron en un tubo *ependorf* de 1.5 ml con la ayuda de un raspador (Biologix cell scraper). Además, el lisado se pasó por una aguja de insulina varias veces para asegurar la lisis celular y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para la obtención de los extractos nucleares, se tomaron $20 \cdot 10^6$ de células y se lavaron dos veces con PBS. Se centrifugaron las células a 3500 rpm a 4 °C durante 5 min. El botón celular se suspendió en un tampón hipotónico (10 mM HEPES pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 1 mM Na_2MoO_4 , 0.004 mM PMSF, 10 % cóctel de inhibidores de proteasas) y se incubó en hielo durante 15 min. Se añadió NP-40 hasta una concentración de 0.6 % y se vortexó fuertemente durante 10 s. Se lavaron los extractos con tampón hipotónico para eliminar contaminantes citosólicos y posteriormente se centrifugaron a máxima velocidad por 30 s. a 4 °C. El sobrenadante obtenido contenía la fracción citoplasmática junto con el RNA. El botón de núcleos restante se lavó dos veces con tampón A para eliminar contaminantes citosólicos y se añadió en tampón hipertónico frío (20 mM HEPES pH 7.6, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 0.2 mM Na_2MoO_4 , 0.001 mM PMSF, 10 % cóctel de inhibidores de proteasas) sin suspender el botón. Se incubó durante 30 min. a 4 °C en rotación y más tarde se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C por 5 min. El sobrenadante corresponde a la fracción nuclear, el cual se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Para la obtención de los extractos mitocondriales, se tomaron $20 \cdot 10^6$ células, se lavaron con PBS y se despegaron de la placa con un raspador. A continuación, la suspensión celular se centrifugó en un tubo de 15 ml (Falcon) a 600g durante 10 min. a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se suspendieron las células en tampón frío (3 ml) (10 mM TRIS-Cl pH 7.4 ajustado con MOPS, 1 mM EGTA, 200 mM sacarosa) y homogeneizadas en un homogeneizador de vidrio a 4°C durante 5 min. Se transfirió el homogeneizado a un tubo de plástico de 50 ml (Falcon) y se centrifugó a 600g durante 10 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió el botón de precipitado en un pequeño volumen (200µl) de tampón frío. Después, se centrifugó a 7000g durante 10 min. a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió el

botón de precipitado en tampón RIPA (50µl) con 10 % cóctel de inhibidores de proteasas. El extracto fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

8.- Estimulaciones con PMA y bolitas de látex.

Las células THP-1 fueron preincubadas con PMA 10ng/ml durante 48 h. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio con bolitas de látex de 2 µm de diámetro, tanto opsonizadas como sin opsonizar con IgG humana, con un MOI: 20. El medio con las bolitas de látex fue reemplazado 2 h. después. Tras un lavado con PBS, se añadió medio de cultivo fresco completo y las células se dejaron 30 min. más en cultivo antes de ser fijadas con PFA al 2 %. No se observaron diferencias entre el tratamiento con bolitas de látex opsonizadas o sin opsonizar.

RESULTADOS

1.- Expresión de NAIP en macrófagos activados con diferentes estímulos.

Los primeros estudios sobre NAIP se centraron en su función antiapoptótica [12, 13, 22, 23]. Por otro lado, una vez conocida la función de NAIP como biosensor de PAMPs en el citoplasma [24] y dado que NAIP tiene un papel importante en la eliminación efectiva de bacterias flageladas como ocurre para *Legionella pneumophila* en macrófagos (MΦ) murinos [25] y humanos [26], pensamos que su función en la respuesta inmunológica innata podría involucrar a alguna de las etapas de la maduración fagosómica en los MΦ [27].

En primer lugar, se estudió la expresión a nivel de RNA mensajero (mRNA) a través de RT-PCR en la línea de Mo humanos THP-1 activados con forbol miristato acetato (PMA). Las células THP-1 estimuladas con PMA son frecuentemente utilizadas como modelo *in vitro* de diferenciación de Mo a MΦ [28], y en la línea de MΦ de ratón RAW expuestas a *Salmonella typhimurium* a distintos tiempos. Como se muestra en la figura 1, los Mo humanos una vez diferenciados y los MΦ murinos reducen la expresión de NAIP tras ser expuestos a estímulos tales como PMA (Fig. 1A) y *Salmonella* (Fig. 1B).

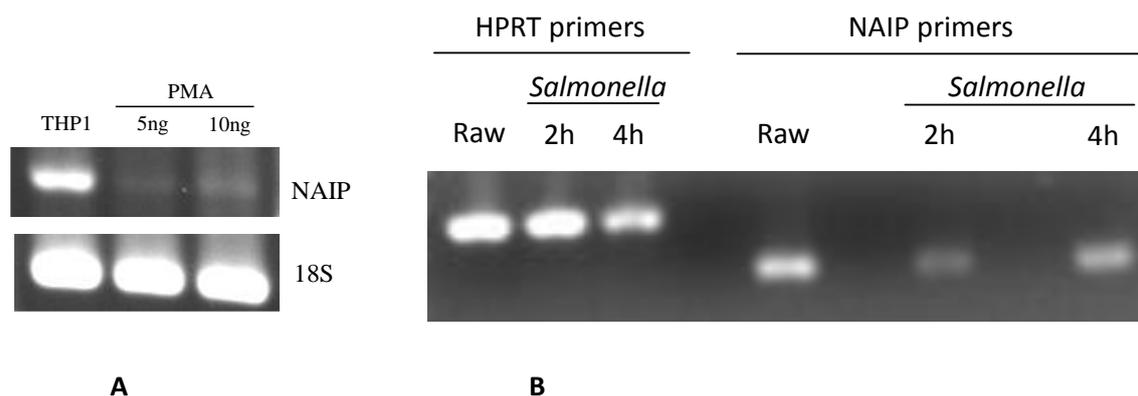


Figura 1 | **Expresión de NAIP mRNA en macrófagos estimulados con PMA y *S. typhimurium*.** RT-PCR a partir de cDNA de THP-1 activados con PMA a diferentes concentraciones y tras 48 h. de estimulación (A) o Raw estimulados con *S. typhimurium* MOI: 50 a las 2 y 4 h. (B). En macrófagos, la expresión de NAIP, a nivel de mensajero, disminuye tras ser expuestos a estímulos como PMA o *Salmonella*. El experimento es representativo de 3 experimentos realizados.

A continuación llevamos a cabo un estudio en Mo THP-1 de la expresión de la proteína NAIP por *Western Blot*, para ello utilizamos un anticuerpo policlonal frente a NAIP generado por el laboratorio del Dr. A. MacKenzie, descubridor de NAIP, antes y después de estimular los Mo con PMA. Como se puede apreciar en la figura 2 y como se observaba al estudiar la expresión del mRNA, la expresión de NAIP disminuye en las células THP-1 al ser estimuladas con PMA. Pensamos que la disminución en la expresión de NAIP está relacionada con la diferenciación de Mo a MΦ, resultado que deberá ser corroborado en otras líneas celulares y en estudios con Mo procedentes de sangre periférica. Del mismo modo, la presencia de NAIP disminuye en extractos nucleares, aunque no tan acusadamente, después de la activación (Fig. 3).

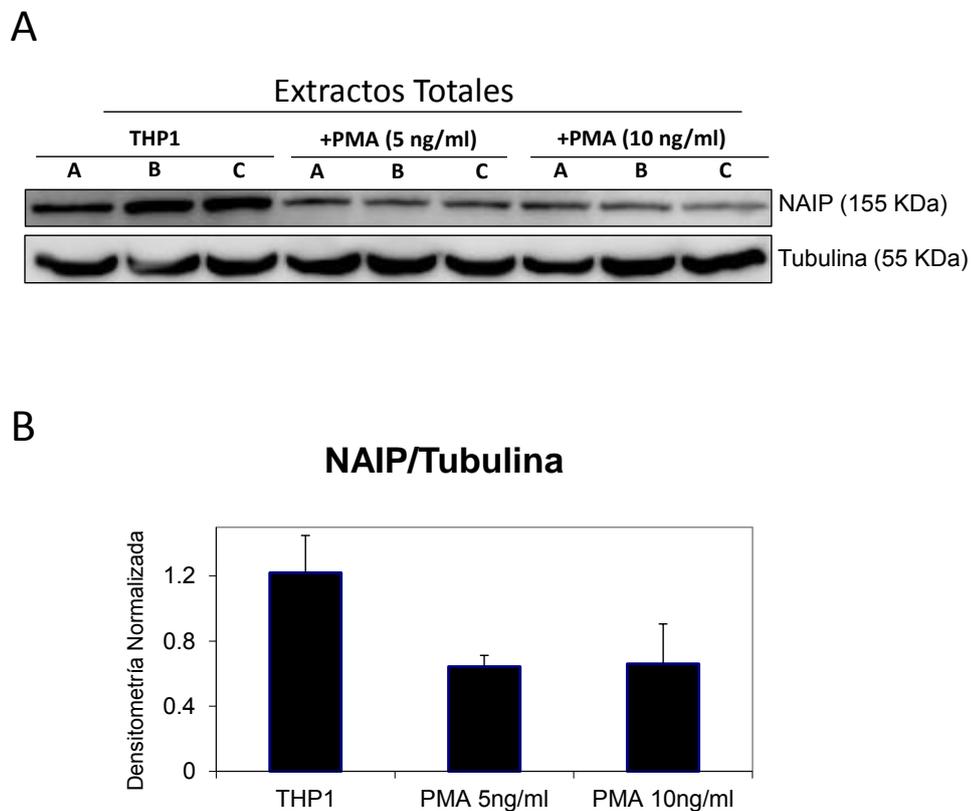


Figura 2 | **NAIP en THP-1 activados con PMA.** (A) Detección por *Western Blot* de NAIP en extractos totales de la línea de monocitos humanos THP-1 48 h. tras la activación con PMA. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. La activación de THP-1 con PMA conlleva a una reducción de NAIP. El experimento mostrado es representativo de 5 experimentos realizados.

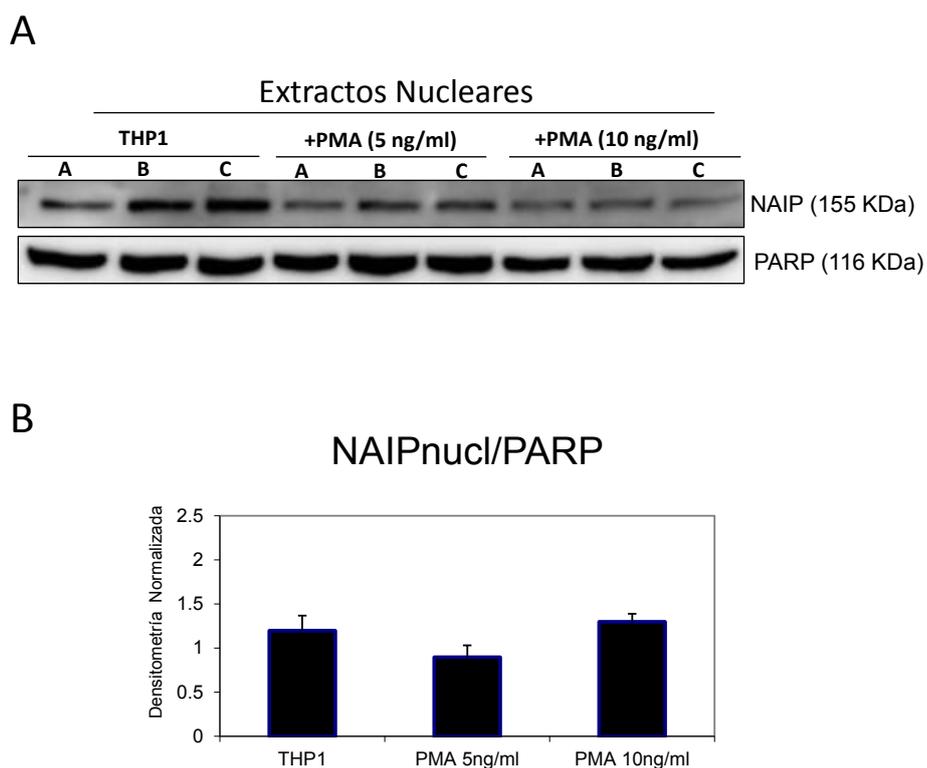


Figura 3 | **NAIP en extractos nucleares en THP-1 activados con PMA.** (A) Detección por *Western Blot* de NAIP en extractos nucleares de THP-1 a las 48 h. tras la activación con PMA. (B) Cuantificación de las bandas del *Immunoblotting* por densitometría. En el núcleo de células THP-1, NAIP disminuye tras la activación con PMA. El experimento mostrado es representativo de 5 experimentos realizados.

2.- Caracterización del anticuerpo frente a NAIP utilizado.

Dada la dificultad para la identificación de NAIP mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos comerciales, quisimos comprobar la especificidad del anticuerpo policlonal generado en el laboratorio del Dr. Alex E. MacKenzie. Para ello, analizamos la presencia de NAIP en extractos proteicos de células THP-1 y Hela tras la sobreexpresión de NAIP mediante la utilización de un adenovirus para NAIP, y comparamos la expresión de NAIP en células transducidas y no transducidas. A la vez, utilizamos algunos de los anticuerpos comerciales frente a NAIP en los extractos proteicos generados.

La utilización de adenovirus como vector para la expresión de NAIP se ha mostrado muy efectiva, especialmente en células Hela donde la proteína no es detectada en células no transducidas (Fig. 4A). Obsérvese una mayor expresión de NAIP en las células Hela en comparación con las THP-1 a las 24 h. de la transducción. El uso de anticuerpos frente a NAIP comerciales en los extractos de células transducidas permitió la detección de la banda de 155 KDa tras la sobreexpresión de la proteína (Fig. 4B). Queremos resaltar que de todos los anticuerpos utilizados, el generado en el laboratorio de A. MacKenzie se ha mostrado como el más efectivo para la detección de NAIP.

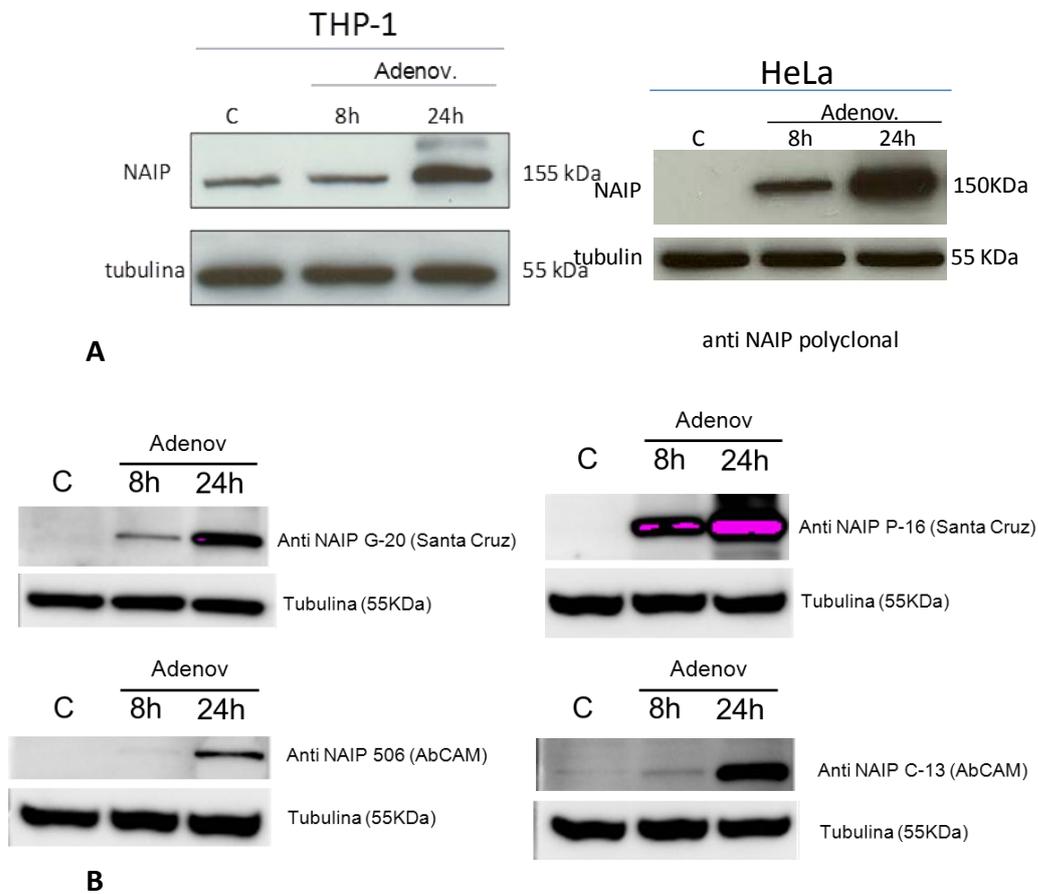
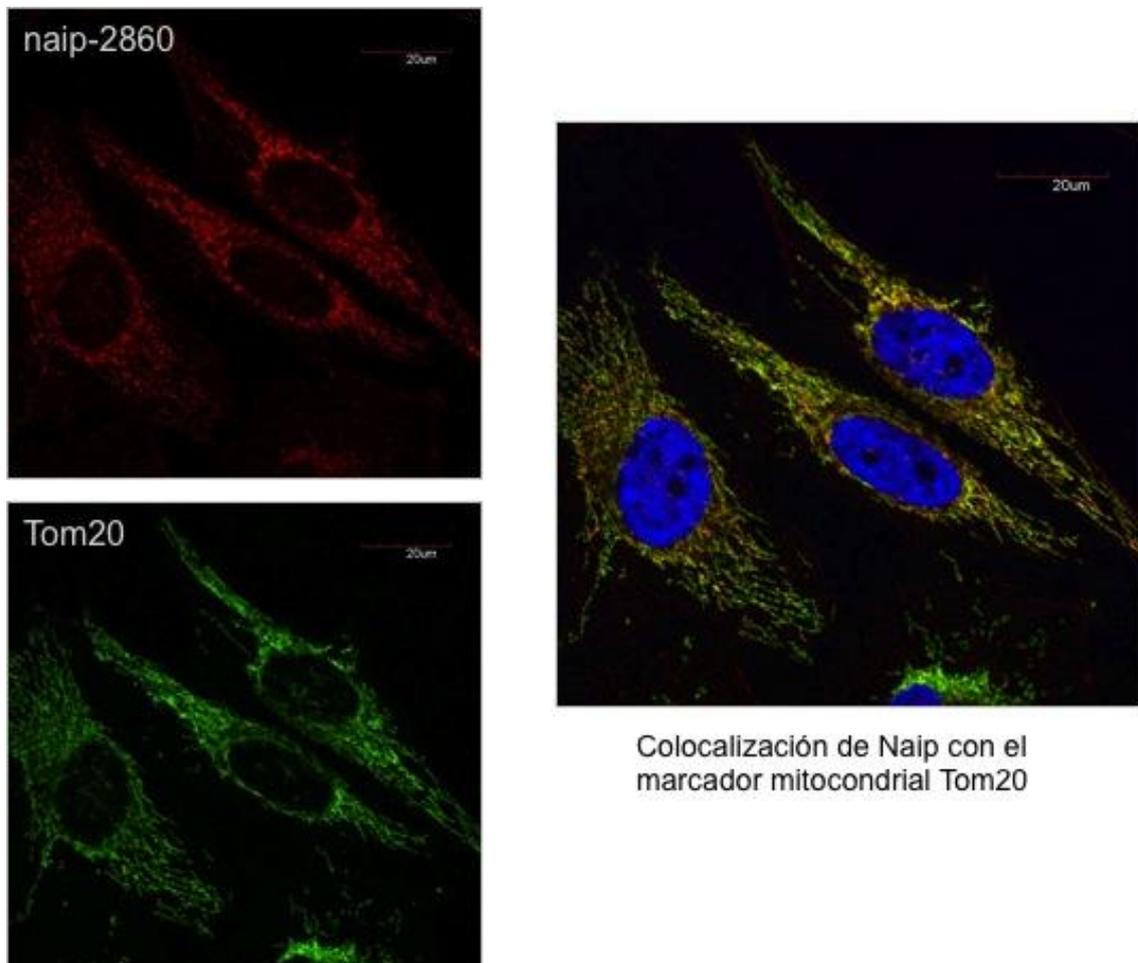


Figura 4 | **Sobreexpresión de NAIP en THP-1 y Hela usando adenovirus.** (A) Detección por *Western Blot* de NAIP en la línea de monocitos humanos THP-1 y células Hela transducidas utilizando un anticuerpo policlonal del Dr. A. MacKenzie. (B) Detección por *Western Blot* de NAIP en Hela transfectadas, usando anticuerpos comerciales policlonales frente a NAIP. En ambas líneas celulares, la expresión de NAIP a las 24 h. de la transducción es muy evidente, siendo mayor en Hela que en THP-1.

3.- Localización subcelular de NAIP.

Paralelamente a los estudios ya reseñados llevamos a cabo un estudio de inmunolocalización para NAIP en células en cultivo. Pensamos que la detección de NAIP a nivel subcelular clarificará la función o funciones que esta proteína desempeña en la fisiología celular. Hemos utilizado diversos anticuerpos dirigidos a diferentes epítotos de la proteína con la intención de estudiar la localización diferencial de las isoformas descritas para NAIP. Los dos anticuerpos monoclonales a los que nos referiremos como NAIP-2860 y NAIP-2857 demuestran una inmunolocalización mitocondrial y citoesquelética respectivamente (Fig. 5A y 5B).



Colocalización de Naip con el marcador mitocondrial Tom20

Figura 5A | Colocalización de NAIP con el marcador mitocondrial Tom20 en células Hela.

El epítipo contra el que se generó el anticuerpo NAIP-2860 comprende a la secuencia localizada entre los residuos 324 y 333 de NAIP, mientras que el anticuerpo NAIP-2857 se generó utilizando como antígeno el péptido que va desde el residuo 961 al 970. Pensamos que las diferencias de localización para NAIP aquí mostradas demuestran una localización diferencial para distintas isoformas de NAIP. NAIP-2860 detectaría una isoforma que comprendería al primer tercio N-terminal de la proteína y NAIP-2857 a otra isoforma, ya descrita (referencia 11 de la introducción) de unos 110kD correspondiente a los dos tercios finales de la proteína.

NAIP-2857

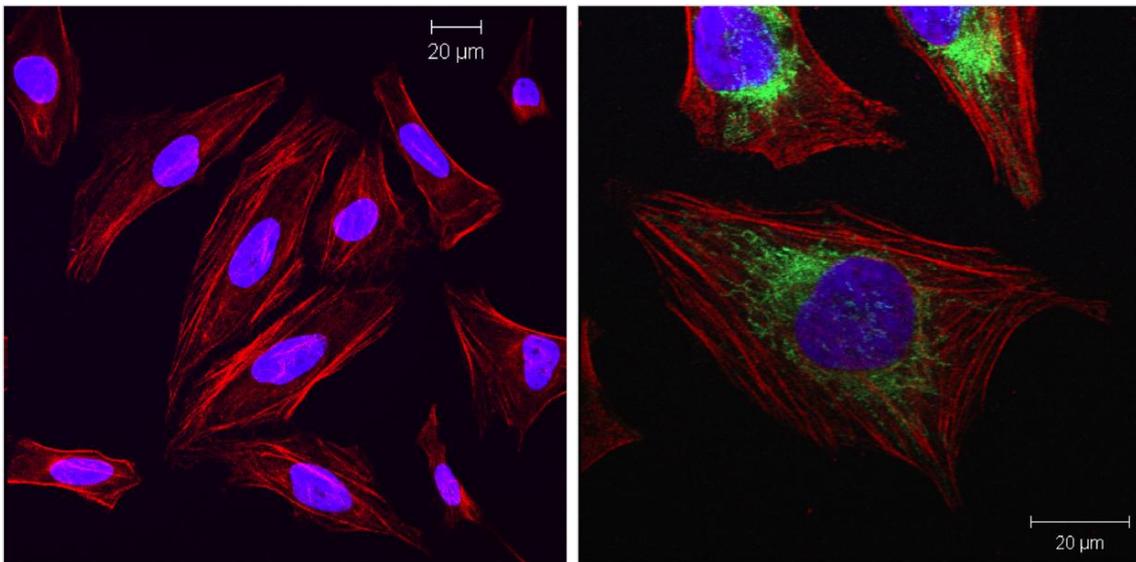


Figura 5B | **Fibras de estrés en células Hela teñidas con el anticuerpo monoclonal NAIP-2857.** En la imagen de la izquierda se puede además apreciar la distribución de la red mitocondrial puesta de manifiesto con el anticuerpo Tom20.

Los tres dominios BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) de NAIP, se encuentran en el primer tercio de la proteína, mientras que el dominio LRR (*leucine-rich repeats*), que se corresponde con la región de NAIP responsable del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, comprende a la parte final de la proteína. Pensamos que una isoforma de NAIP que se corresponde con la región IAP, es decir la parte de

NAIP responsable de las funciones antiapoptóticas, es de localización mitocondrial y otra isoforma que carece de estos dominios antiapoptóticos y que se corresponde con la parte NLR de NAIP es de localización citoesquelética.

El tercer anticuerpo perteneciente al laboratorio del Dr. A. Mackenzie que hemos utilizado en este estudio se generó utilizando como inmunógeno al péptido comprendido entre los residuos 1 al 490 de la proteína. Denominado como NAIP-J2, este anticuerpo policlonal muestra una localización nuclear, y mitocondrial (Fig. 6).

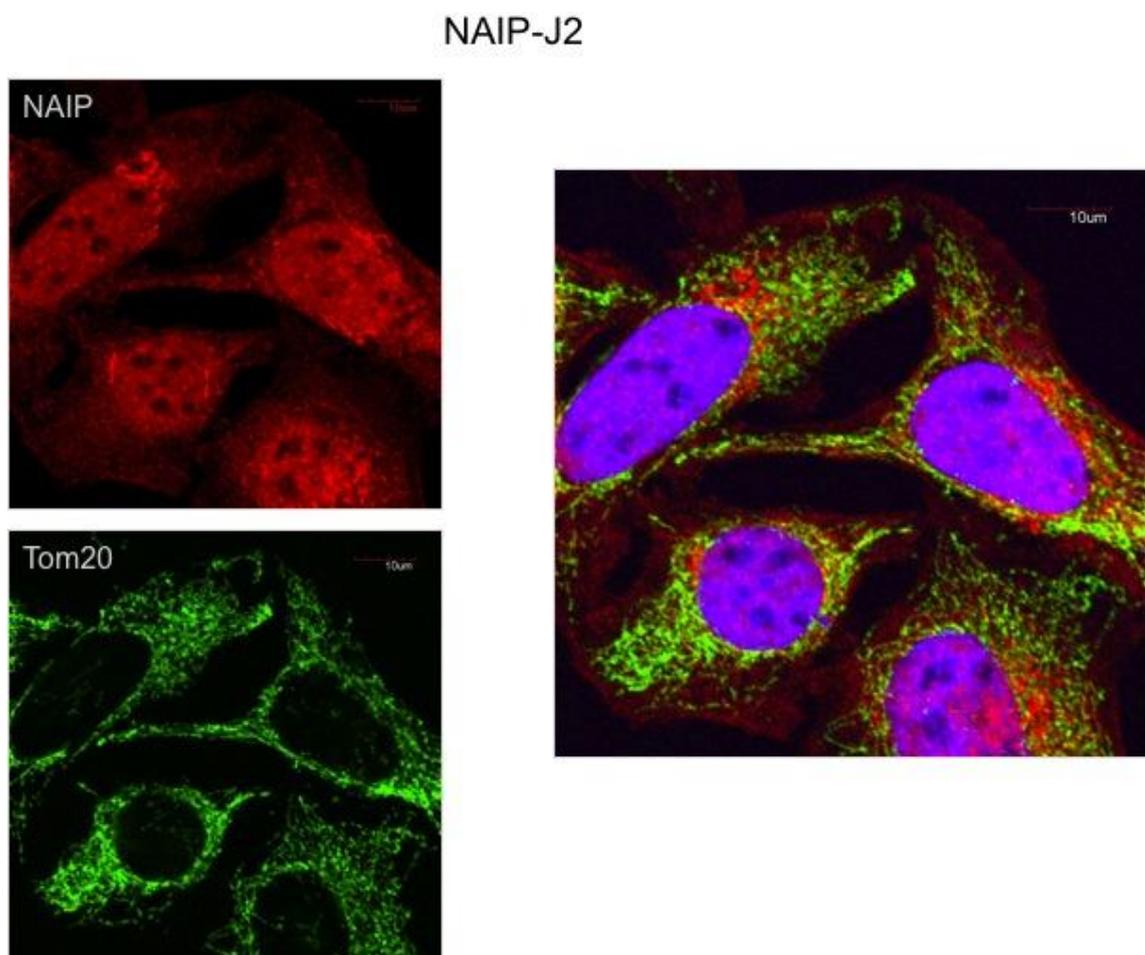


Figura 6 | Células HeLa en las que se pone de manifiesto la localización nuclear y mitocondrial de NAIP mediante la utilización del anticuerpo NAIP-J2.

Una vez utilizados los anticuerpos del laboratorio del Dr. A. MacKenzie quisimos corroborar mediante la utilización de anticuerpos comerciales los resultados anteriormente obtenidos, para ello utilizamos un anticuerpo dirigido a la región N-terminal de NAIP de *Santa Cruz* (Sc-11059) y otro policlonal de *Abcam* (ab25968) (Fig.7A y 7B). Como esperábamos el anticuerpo de *Santa Cruz* muestra la localización mitocondrial y el anticuerpo de *Abcam* es capaz de poner de manifiesto las tres localizaciones, nuclear, mitocondrial y citoesquelética, antes descritas para los anticuerpos del laboratorio de A. MacKenzie. La utilización del panel de anticuerpos contra NAIP aquí descrita y teniendo en cuenta las distintas regiones de NAIP que han sido utilizadas como inmunógenos para la obtención de dichos anticuerpos ponen de manifiesto la existencia de diversas isoformas de NAIP.

Santa Cruz N-terminal anti-NAIP

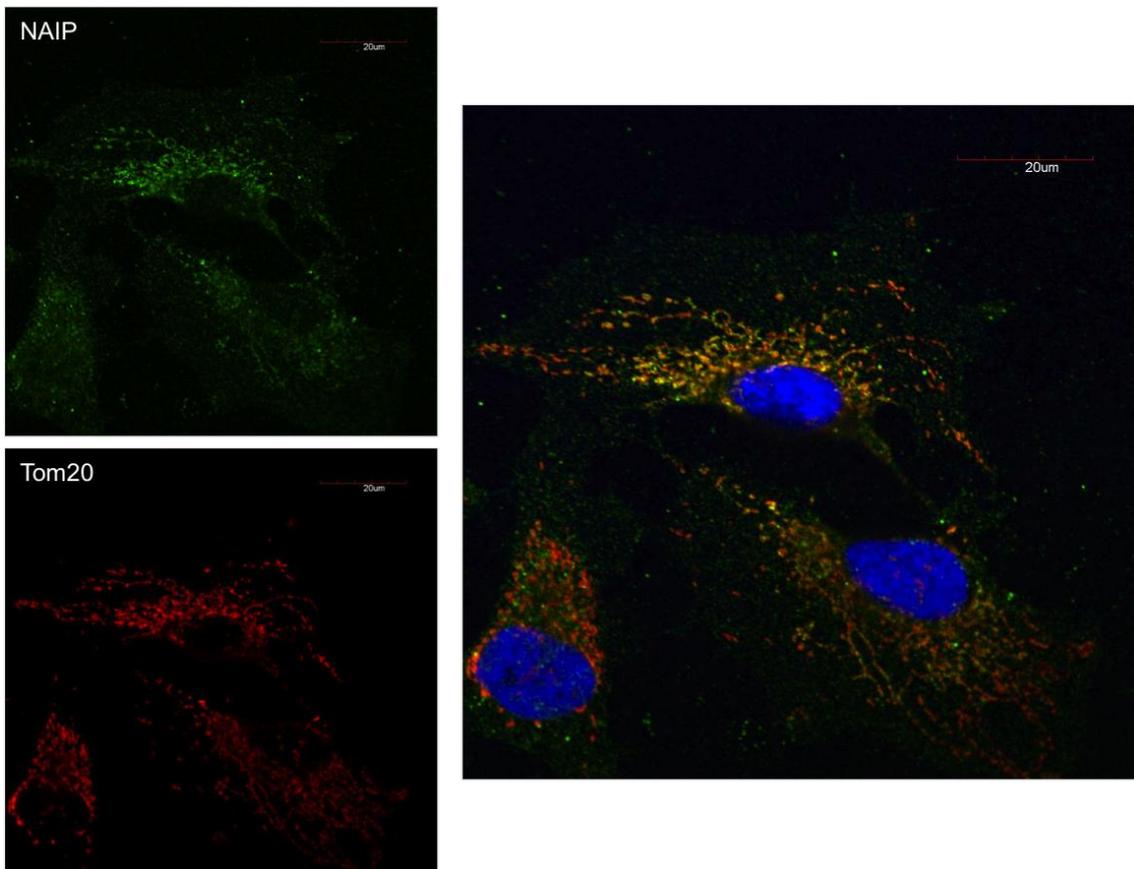


Figura 7A | Células Hela en las que se pone de manifiesto la localización mitocondrial de NAIP mediante la utilización de un anticuerpo contra la región N-terminal de NAIP.

Las imágenes mostradas son representativas de resultados también obtenidos en otros tipos celulares como son los Mo humanos THP-1, MΦ de ratón Raw264.7, MΦ peritoneales de ratón, la línea de fibroblastos humanos GM38 y células humanas derivadas de osteosarcoma U2os.

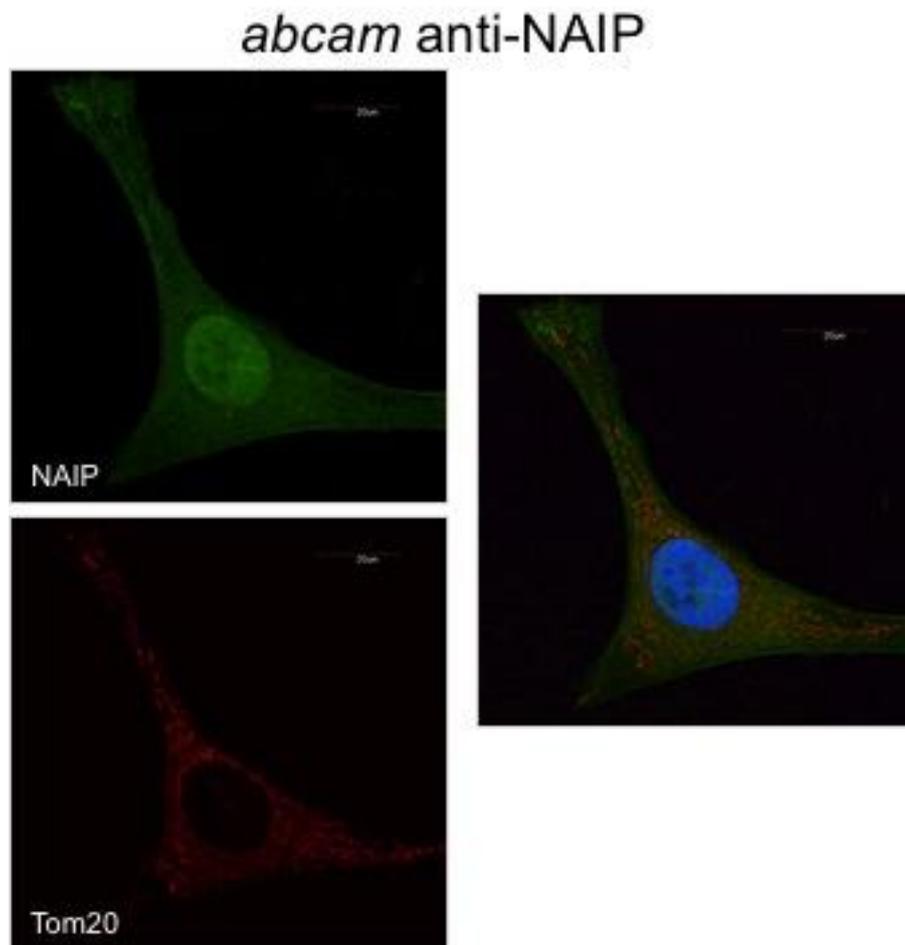


Figura 7B | **Localización nuclear, mitocondrial y citoesquelética para NAIP en células Hela puesta de manifiesto mediante la utilización de un anticuerpo de *Abcam*.**

Con objeto de comprobar si diferentes isoformas de NAIP se pueden asociar con las distintas localizaciones para NAIP puestas de manifiesto en las imágenes microscópicas hasta ahora descritas, hicimos un estudio mediante *western blot* en extractos totales, nucleares y mitocondriales en células HeLa y THP-1. Utilizamos el anticuerpo policlonal NAIP-J2 que reconoce los primeros 490 aminoácidos de la proteína y que en microscopía se mostró como el más efectivo a la hora de poner de manifiesto la sublocalización celular anteriormente descrita. Hemos comprobado que la versión completa de NAIP (155 kD) tiene una localización nuclear, que con este anticuerpo se detecta una versión de 62 kD de localización mitocondrial y además detectamos en células HeLa bandas de unos 90 kD y 100 kD (Fig 8).

Combinando estos resultados con los obtenidos en los estudios de inmunodetección microscópica pensamos que: a) la versión mitocondrial de NAIP se corresponde con una isoforma que comprendería al primer tercio de la versión completa de NAIP, esta isoforma sería la versión antiapoptótica de NAIP. b) Las bandas entorno a los 100 kD se corresponderían con una isoforma asociada al citoesqueleto celular, que esta isoforma que comprende a los módulos NLR de NAIP representa a las versiones de 100 kD y 110 kD ya descritas para NAIP (referencia 11 de la introducción) y c) que la versión completa de NAIP es de localización nuclear.

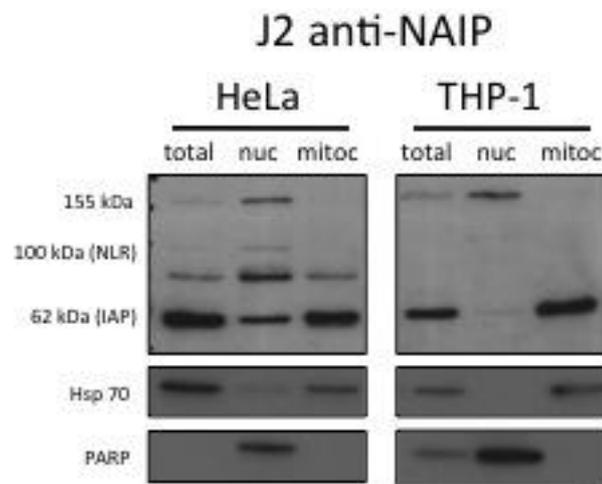


Figura 8 | **Detección por *western blot* de NAIP en extractos totales, nucleares y mitocondriales en células HeLa y THP-1.** Como control para determinar la pureza de los extractos obtenidos se utilizó un anticuerpo anti-PARP para los extractos nucleares y un anticuerpo anti-HSP70 para los extractos mitocondriales. La versión completa de NAIP (155 kD) se corresponde con una localización nuclear, una isoforma de unos 62 kD se detecta en los extractos mitocondriales. Además, en los extractos de células HeLa se aprecian bandas alrededor de los 100 kD. El *western blot* mostrado es representativo de 3 experimentos realizados.

4.- Estudio preliminar de la función de NAIP en la fagocitosis.

En macrófagos murinos deficientes en NAIP, *Legionella* sobrevive intracelularmente al evadir las rutas endocíticas en etapas tempranas de la maduración del fagosoma. La creación de un orgánulo de replicación con marcadores característicos del retículo endoplasmático evita la fusión con los lisosomas [27]. Por tanto, si la participación de NAIP es necesaria para una eliminación efectiva de *Legionella pneumophila* en MΦ murinos [25] y humanos [26] cabe pensar que NAIP podría tener un papel durante el proceso de fagocitosis.

Para confirmar esta hipótesis se estudió la relación de NAIP con los fagosomas de MΦ (THP-1 activados con PMA) y si existía colocalización de esta proteína con marcadores fagosomales como son EEA1 [29] y Rab5 [30]. Con el fin de analizar la distribución de NAIP se tiñeron MΦ THP-1, estimulados con bolitas de látex, con anticuerpos policlonales frente a NAIP más un segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo y se visualizaron por microscopía confocal. En células en reposo, NAIP presenta un patrón punteado homogéneo. Al estimular el MΦ con las bolitas de látex, NAIP es reclutado alrededor del fagosoma (Fig. 9).

De igual modo, las células THP-1 pretratadas con PMA fueron estimuladas con bolitas de látex durante 2 horas, pasado ese tiempo el medio se cambió y se comenzó el protocolo de inmunofluorescencia para los correspondientes anticuerpos, anti-NAIP junto con Rab5 (Fig. 10) o EEA1 (Fig. 11), marcadores tempranos del proceso de fagocitosis. NAIP colocalizó tanto con Rab5 como con EEA1 alrededor del fagosoma, lo que indicaría un papel de NAIP al menos durante las etapas iniciales de fagocitosis. ¿Con qué proteína o proteínas interacciona? ¿Cuál es su función en la fagocitosis? Éstas son cuestiones que aún están por determinar.

NAIP presence in latex bead phagosomes

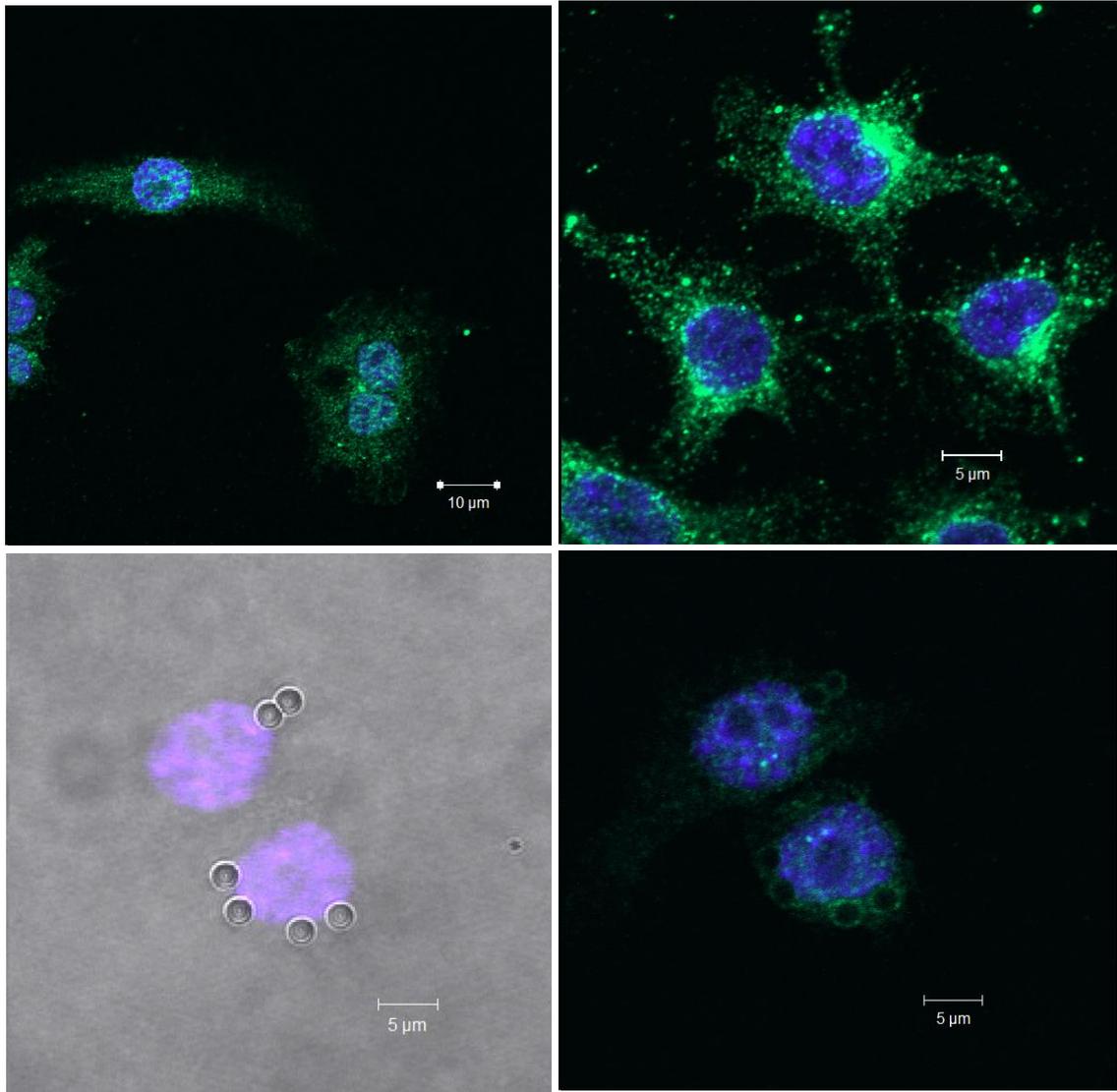


Figura 9 | ***AntiNAIP + anti rabbit-Alexa fluor⁴⁸⁸*** detectado por inmunofluorescencia y **microscopía confocal**. Se observa una distribución de NAIP punteada homogénea en macrófagos en reposo. Dos horas después de añadir las bolitas de latex al cultivo, se observa la presencia alrededor del fagosoma que contiene la bolita de látex. Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado de 3.

NAIP colocalization with Rab5

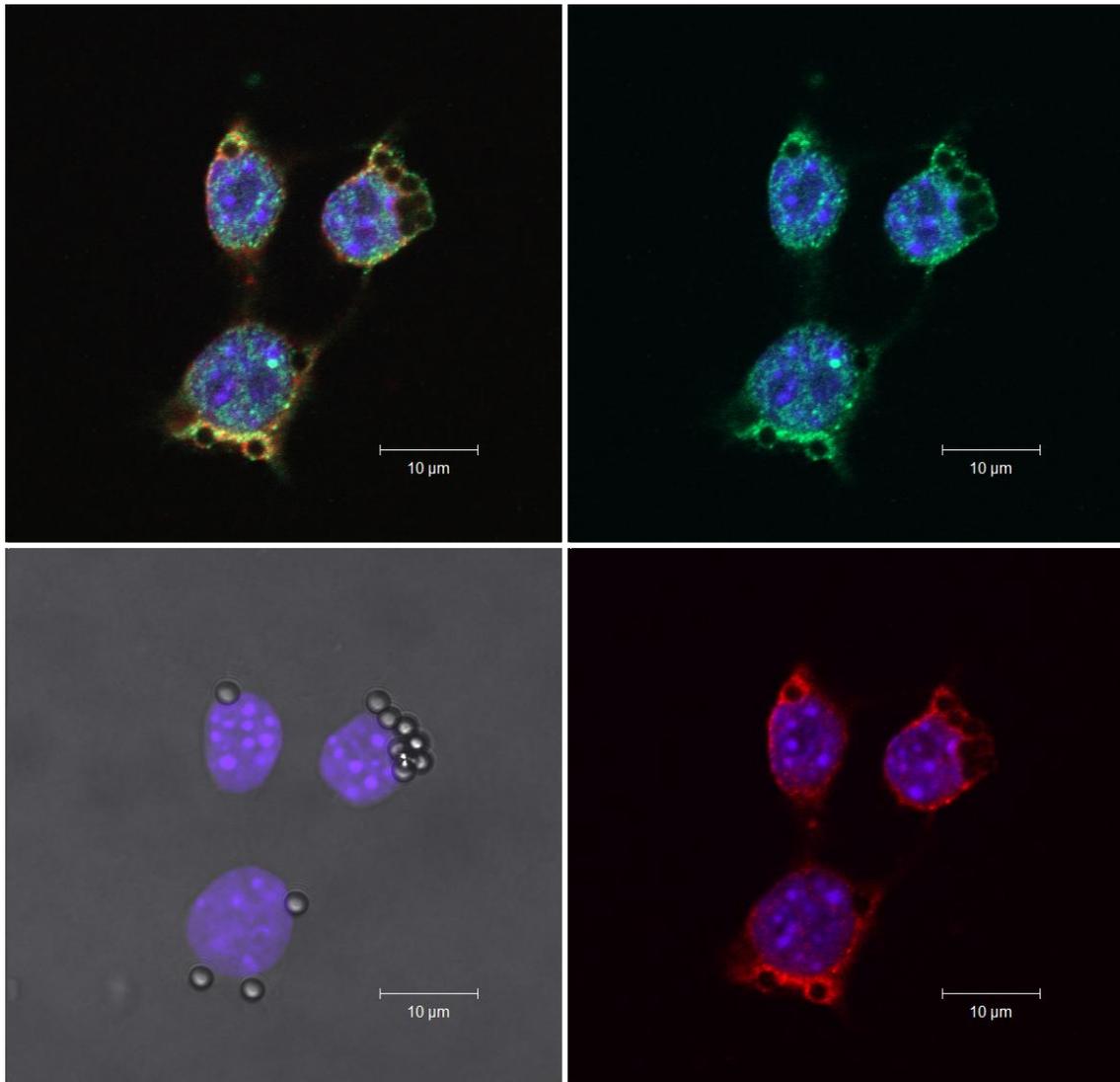


Figura 10 | ***Anti NAIP + anti rabbit–Alexa fluor⁴⁸⁸*** y ***Anti Rab5 + anti mouse–Alexa fluor⁵⁹⁴*** detectado por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se observa una colocalización de NAIP con Rab5, marcador temprano de fagocitosis, en macrófagos tratados con bolitas de látex durante 120 minutos. Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado de 3.

NAIP colocalization with EEA1

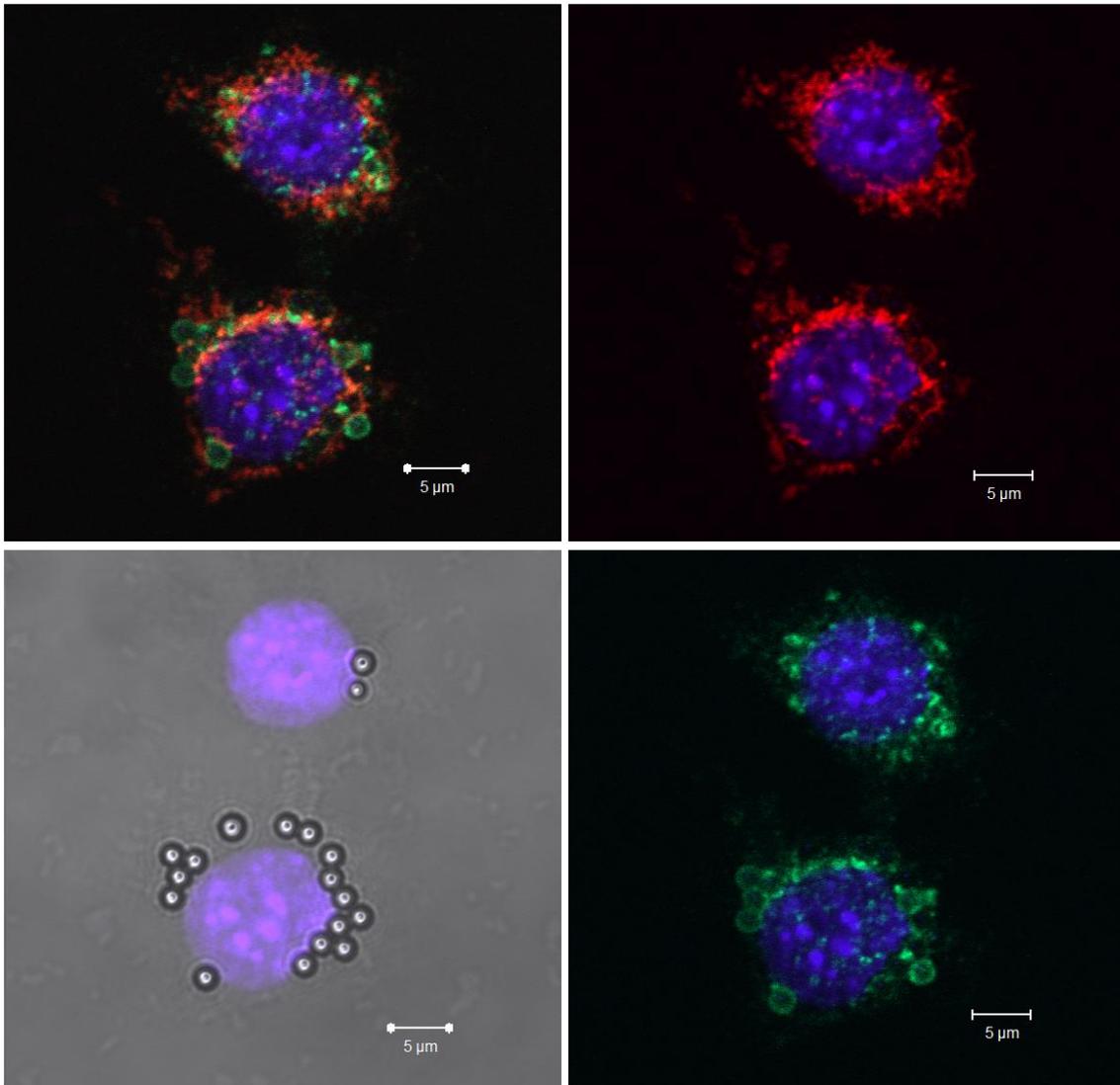


Figura 11 | Anti NAIP + anti rabbit–Alexa fluor⁴⁸⁸ y Anti Rab5 + anti mouse–Alexa fluor⁵⁹⁴ detectado por inmunofluorescencia y microscopía confocal. NAIP y EEA1 colocalizan en macrófagos activados con bolitas de látex durante 120 minutos. Fotografías representativas de 1 experimento seleccionado entre 3.

DISCUSIÓN

Expresión de NAIP en macrófagos activados con diferentes estímulos.

NAIP es una proteína distintiva, ya que pertenece a la familia de NLRs y a la familia de IAPs. NAIP está constituida por dominios que le otorgan funciones diferentes funciones. Por una parte actúa como biosensor de microorganismos patógenos por su dominio relacionado con los NLRs [1], además, al igual que otros miembros de los IAPs [12, 13], posee una función antiapoptótica. Dada la participación NAIP en la respuesta inmunitaria innata, funcionando como receptor citoplasmático de PAMPs [24], y puesto que NAIP tiene un papel crítico en la eliminación efectiva de bacterias flageladas como es el caso de *Legionella pneumophila* en MΦ murinos y de ratón [25, 26], nuestro grupo estudió si NAIP podría tener un papel en alguna de las etapas de la maduración fagosómica [27].

El análisis de la expresión de NAIP a nivel de RNA mensajero a través de RT-PCR en la línea de Mo humanos THP-1 activados con PMA, modelo *in vitro* de diferenciación de Mo a MΦ [28], mostró una disminución en la expresión de NAIP. También se detectó una bajada de mRNA en la línea de MΦ de ratón RAW expuestos a *Salmonella typhimurium* (Fig. 1). Este efecto en THP-1 fue confirmado al estudiar la expresión de la proteína NAIP, por *Western Blot*, tras estimular con PMA, observándose una disminución tras el estímulo en extractos citosólicos y menos drástica en extractos nucleares (Fig. 3). Por lo tanto, la expresión de NAIP se reduce en Mo humanos una vez diferenciados con PMA, lo que sugiere que la disminución en la expresión de NAIP podría estar relacionada con la diferenciación de Mo a MΦ. No obstante, este resultado que debe ser corroborado en otras líneas celulares y en estudios con Mos procedentes de sangre periférica.

Caracterización del anticuerpo utilizado en la detección de NAIP.

El análisis comparativo entre los anticuerpos generados frente a NAIP confirmó que el anticuerpo policlonal desarrollado en el laboratorio de A. MacKenzie fue el que mostró mejores resultados al ser comparado con los anticuerpos comerciales testados por *Western Blot*. Además, el uso de adenovirus como medio de la expresión de NAIP resultó muy efectivo,

ya que en la línea Hela, en la que apenas es detectado NAIP, tras la transducción se detecta una clara sobreexpresión de NAIP, superior a la expresión en las células THP-1 a las 24 h. de la transducción (Fig. 4A).

Localización subcelular de NAIP.

El gen NAIP está localizado en la especie humana en el cromosoma 5q13.2, región sujeta a una elevada variabilidad genética y que muestra variaciones para el número de copias génicas [10]. Por otra parte, además de la versión completa del gen NAIP, existen cuatro versiones parcialmente truncadas del gen completo de NAIP. Además, se han descrito varios transcritos de NAIP, parálogos y nuevas transcripciones, que codifican marcos de lectura abiertos mermados. Las proteínas correspondientes se traducen en ciertas líneas celulares y tejidos primarios.

A través de microscopía confocal, se realizó un estudio de inmunolocalización para NAIP en células en cultivo utilizando diversos anticuerpos dirigidos a diferentes epítotos de la proteína con objeto de estudiar la localización diferencial de las isoformas descritas para NAIP, pensamos que la detección de NAIP a nivel subcelular podría aclarar la función que desempeña en la fisiología celular.

El epítoto frente el que se generó el anticuerpo monoclonal NAIP-2860 comprende a la secuencia localizada entre los residuos 324 y 333 de NAIP, dando una inmunolocalización mitocondrial, mientras que el anticuerpo monoclonal NAIP-2857 que se generó utilizando como antígeno el péptido que va desde el residuo 961 al 970, muestra una inmunolocalización citoesquelética (Fig. 5A y 5B).

Pensamos que las diferencias de localización para NAIP aquí mostradas demuestran una localización diferencial para distintas isoformas de NAIP. El anticuerpo NAIP-2860 detectaría una isoforma que comprendería al primer tercio N-terminal de la proteína. Esta región corresponde a los 3 dominios BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) de NAIP.

El anticuerpo NAIP-2857 reconocería a otra isoforma de unos 110kD correspondiente a los dos tercios finales de la proteína. En esta región se incluye el dominio LRR (*leucine-rich repeats*), que se corresponde con la región de NAIP responsable del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Esta isoforma ya descrita por Romanish y

colaboradores [11] carece de sus motivos de unión a caspasas, lo que sugiere que podría tener funciones diferentes.

Creemos que una isoforma de NAIP que se corresponde con la región IAP, es decir, la parte de NAIP responsable de las funciones antiapoptóticas, es de localización mitocondrial y otra isoforma que carece de estos dominios antiapoptóticos, que se corresponde con la parte NLR de NAIP, es de localización citoesquelética.

Por otra parte, el anticuerpo policlonal NAIP-J2, generado en el laboratorio del Dr. A. Mackenzie y desarrollado frente a un péptido que comprende los primeros 490 AAs de la NAIP, mostró una localización nuclear, y mitocondrial (Fig. 6).

Los resultados obtenidos con los anticuerpos del laboratorio del Dr. A. MacKenzie fueron contrastados con los resultados de anticuerpos comerciales. Así, se usó un anticuerpo dirigido a la región N-terminal de NAIP de *Santa Cruz* (Sc-11059) y otro policlonal de *Abcam* (ab25968) (Fig.7A y 7B). Confirmando los datos expuestos anteriormente, el anticuerpo de *Santa Cruz* muestra la localización mitocondrial y el anticuerpo de *Abcam* es capaz de poner de manifiesto las tres localizaciones, nuclear, mitocondrial y citoesquelética, antes descritas para los anticuerpos del laboratorio de A. MacKenzie. La utilización del panel de anticuerpos contra NAIP aquí descrita y teniendo en cuenta las distintas regiones de NAIP que han sido utilizadas como inmunógenos para la obtención de dichos anticuerpos ponen de manifiesto la existencia de diversas isoformas de NAIP.

Estos resultados fueron reproducibles en distintos tipos celulares como son los Mo humanos THP-1, MΦ de ratón Raw 264.7, MΦ peritoneales de ratón, la línea de fibroblastos humanos GM38 y células humanas derivadas de osteosarcoma U2os.

Para verificar si las diferentes isoformas de NAIP se asociaban con las distintas localizaciones para NAIP como se observó por microscopía confocal, se realizó un estudio mediante *western blot* en extractos totales, nucleares y mitocondriales en células Hela y THP-1, usando el anticuerpo policlonal NAIP-J2 generado frente a los primeros 490 Aa de NAIP. Recordemos que este anticuerpo fue muy efectivo en el reconocimiento de NAIP en los distintos compartimentos celulares. Los resultados confirmaron lo observado por microscopía detectando la versión completa de NAIP (155 kD) tiene una localización nuclear, una versión de 62kD de localización mitocondrial y además, se detectó en células Hela bandas de unos 90 kD y 100 kD (Fig 8).

Tomando estos datos en conjunto, se puede deducir que la versión completa de NAIP tiene una localización nuclear, y que además existen otras isoformas. Una de ellas mitocondrial que comprendería al primer tercio de la versión completa de NAIP, la versión antiapoptótica de NAIP; y otra isoforma con bandas entorno a los 100kD asociada al citoesqueleto celular, correspondiente a los región NLR de NAIP que representaría a las versiones de 100kD y 110kD ya descritas [11].

Papel de NAIP en la fagocitosis.

Existen distintos estudios que confirman que NAIP es crucial para una eliminación efectiva de *Legionella pneumophila* en MΦ murinos [25] y humanos [26]. Se ha descrito que *Legionella pneumophila* es capaz de sobrevivir intracelularmente en los MΦ murinos deficientes en NAIP, al evadir la maduración fagosómica durante las etapas tempranas de la ruta fagosómica. Este mecanismo de escape consiste en la formación de un orgánulo de replicación que expresa marcadores característicos del retículo endoplasmático el cual evita la fusión con los lisosomas [27]. Según estos datos, nos preguntamos si NAIP tendría un papel durante el proceso de fagocitosis.

Para responder a esta cuestión, se estudió la relación de NAIP con los fagosomas, en MΦ (células THP-1 tratados con PMA), determinando si existía colocalización de esta proteína con marcadores fagosomales tales como EEA1 [29] y Rab5 [30], marcadores de las fases tempranas de la fagocitosis. Mediante microscopía confocal se pudo observar que, NAIP en células en reposo presenta un patrón punteado homogéneo, sin embargo, tras exponer a los MΦ a las bolitas de látex, NAIP es reclutado alrededor del fagosoma (Fig. 9). En estos macrófagos pretratados con PMA y que fagocitaron bolitas de látex, se puso de manifiesto en las imágenes de microscopía confocal, que NAIP colocaliza tanto con Rab5 (Fig. 10) como con EEA1 (Fig. 11) alrededor del fagosoma, lo que sugiere un papel de NAIP a lo largo de las primeras etapas de la maduración fagosómica. Sería muy interesante determinar qué función realiza NAIP en este proceso de fagocitosis y con qué proteínas interacciona.

CONCLUSIONES

1.- El nivel de expresión de NAIP disminuye en monocitos THP-1 tratados con PMA, lo que apunta a una intervención de NAIP en la diferenciación de monocito a macrófago.

2.- Hemos identificado distintas versiones de NAIP. La versión completa se distribuye por toda la célula aunque principalmente está enriquecida en el núcleo. Además, hay una isoforma IAP de unos 60 kDa aproximadamente en la mitocondria y otra isoforma NLR asociada al citoesqueleto celular de 100-110 kDa. Hallazgos que aún precisan de otras confirmaciones a nivel proteómico y/o transcripcional.

3.- NAIP está localizado junto a EEA1 y Rab5 alrededor del fagosoma, lo que apunta hacia la intervención de NAIP en las etapas tempranas de la fagocitosis.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Williams, A., Flavell, R. A. and Eisenbarth, S. C.**, The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2010. **22**: 34-40.
- 2 **Bryant, C. and Fitzgerald, K. A.**, Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 2009. **19**: 455-464.
- 3 **Ye, Z. and Ting, J. P.**, NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol* 2008. **20**: 3-9.
- 4 **Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X. and et al.**, The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995. **80**: 167-178.
- 5 **Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A. and Korneluk, R. G.**, Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996. **379**: 349-353.
- 6 **Lesne, S., Gabriel, C., Nelson, D. A., White, E., Mackenzie, E. T., Vivien, D. and Buisson, A.**, Akt-dependent expression of NAIP-1 protects neurons against amyloid- β toxicity. *J Biol Chem* 2005. **280**: 24941-24947.
- 7 **Crocker, S. J., Wigle, N., Liston, P., Thompson, C. S., Lee, C. J., Xu, D., Roy, S., Nicholson, D. W., Park, D. S., MacKenzie, A., Korneluk, R. G. and Robertson, G. S.**, NAIP protects the nigrostriatal dopamine pathway in an intrastriatal 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2001. **14**: 391-400.
- 8 **Seidl, R., Bajo, M., Bohm, K., LaCasse, E. C., MacKenzie, A. E., Cairns, N. and Lubec, G.**, Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-like immunoreactivity in brains of adult patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 1999. **57**: 283-291.
- 9 **Hebb, A. L., Moore, C. S., Bhan, V., Campbell, T., Fisk, J. D., Robertson, H. A., Thorne, M., Lacasse, E., Holcik, M., Gillard, J., Crocker, S. J. and Robertson, G. S.**, Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Mult Scler* 2008. **14**: 577-594.
- 10 **Schmutz, J., Martin, J., Terry, A., Couronne, O., Grimwood, J., Lowry, S., Gordon, L. A., Scott, D., Xie, G., Huang, W., Hellsten, U., Tran-Gyamfi, M., She, X., Prabhakar, S., Aerts, A., Altherr, M., Bajorek, E., Black, S., Branscomb, E., Caoile, C., Challacombe, J. F., Chan, Y. M., Denys, M., Detter, J. C., Escobar, J., Flowers, D., Fotopulos, D., Glavina, T., Gomez,**

- M., Gonzales, E., Goodstein, D., Grigoriev, I., Groza, M., Hammon, N., Hawkins, T., Haydu, L., Israni, S., Jett, J., Kadner, K., Kimball, H., Kobayashi, A., Lopez, F., Lou, Y., Martinez, D., Medina, C., Morgan, J., Nandkeshwar, R., Noonan, J. P., Pitluck, S., Pollard, M., Predki, P., Priest, J., Ramirez, L., Retterer, J., Rodriguez, A., Rogers, S., Salamov, A., Salazar, A., Thayer, N., Tice, H., Tsai, M., Ustaszewska, A., Vo, N., Wheeler, J., Wu, K., Yang, J., Dickson, M., Cheng, J. F., Eichler, E. E., Olsen, A., Pennacchio, L. A., Rokhsar, D. S., Richardson, P., Lucas, S. M., Myers, R. M. and Rubin, E. M., The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* 2004. **431**: 268-274.
- 11 **Romanish, M. T., Nakamura, H., Lai, C. B., Wang, Y. and Mager, D. L.,** A novel protein isoform of the multicopy human NAIP gene derives from intragenic Alu SINE promoters. *PLoS One* 2009. **4**: e5761.
- 12 **Maier, J. K., Lahoua, Z., Gendron, N. H., Fetni, R., Johnston, A., Davoodi, J., Rasper, D., Roy, S., Slack, R. S., Nicholson, D. W. and MacKenzie, A. E.,** The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 2002. **22**: 2035-2043.
- 13 **Davoodi, J., Ghahremani, M. H., Es-Haghi, A., Mohammad-Gholi, A. and Mackenzie, A.,** Neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP, is an inhibitor of procaspase-9. *Int J Biochem Cell Biol* 2010. **42**: 958-964.
- 14 **Kofoed, E. M. and Vance, R. E.,** Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* 2011. **477**: 592-595.
- 15 **Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y. N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L. and Shao, F.,** The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 2011. **477**: 596-600.
- 16 **Yang, J., Zhao, Y., Shi, J. and Shao, F.,** Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013. **110**: 14408-14413.
- 17 **Kofoed, E. M. and Vance, R. E.,** NAIPs: building an innate immune barrier against bacterial pathogens. NAIPs function as sensors that initiate innate immunity by detection of bacterial proteins in the host cell cytosol. *Bioessays* 2012. **34**: 589-598.
- 18 **Katagiri, N., Shobuike, T., Chang, B., Kukita, A. and Miyamoto, H.,** The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.* **14**: 1123-1132.
- 19 **Chomczynski, P. and Sacchi, N.,** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. **162**: 156-159.
- 20 **Bradford, M. M.,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976. **72**: 248-254.

- 21 **Kricka, L. J., Voyta, J. C. and Bronstein, I.**, Chemiluminescent methods for detecting and quantitating enzyme activity. *Methods Enzymol* 2000. **305**: 370-390.
- 22 **Liston, P., Young, S. S., Mackenzie, A. E. and Korneluk, R. G.**, Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 1997. **2**: 423-441.
- 23 **Davoodi, J., Lin, L., Kelly, J., Liston, P. and MacKenzie, A. E.**, Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *J Biol Chem* 2004. **279**: 40622-40628.
- 24 **Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M. and Vance, R. E.**, Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 2008. **9**: 1171-1178.
- 25 **Diez, E., Lee, S. H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S. and Gros, P.**, Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. *Nat Genet* 2003. **33**: 55-60.
- 26 **Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A. C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'Guessan P, D., Gunther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N. and Opitz, B.**, NAIP and Ipaf control Legionella pneumophila replication in human cells. *J Immunol* 2008. **180**: 6808-6815.
- 27 **Fortier, A., de Chastellier, C., Balor, S. and Gros, P.**, Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* 2007. **9**: 910-923.
- 28 **Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. and Tada, K.**, Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982. **42**: 1530-1536.
- 29 **Lawe, D. C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D. and Corvera, S.**, The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem* 2000. **275**: 3699-3705.
- 30 **Diez, E., Yaraghi, Z., MacKenzie, A. and Gros, P.**, The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with Legionella pneumophila. *J Immunol* 2000. **164**: 1470-1477.