



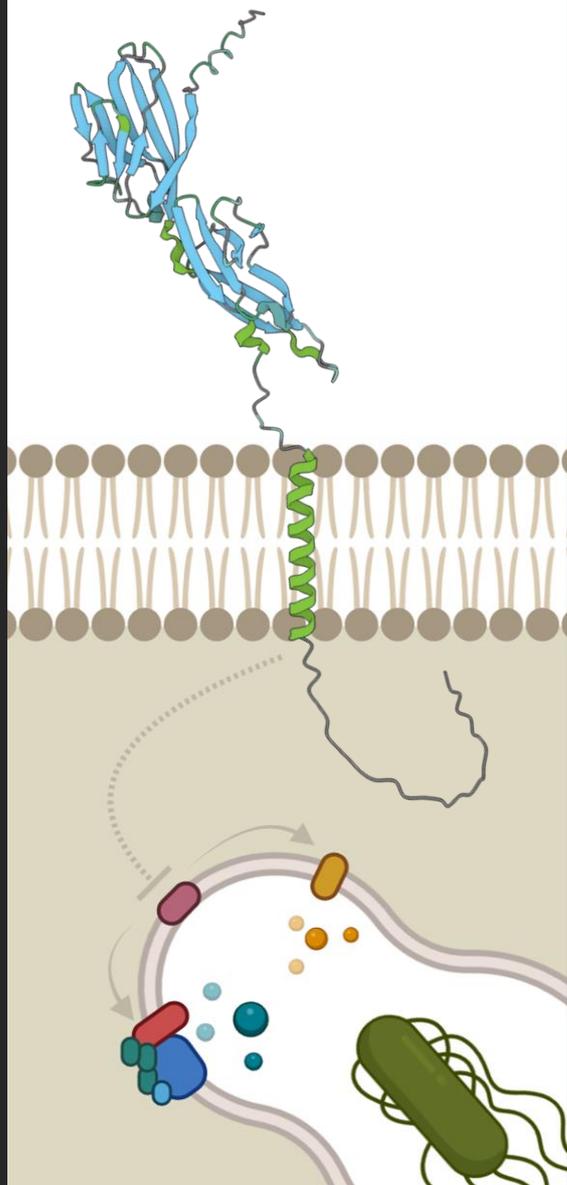
**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



**Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular III e Inmunología**

Programa de Doctorado en Biomedicina

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE SLAMF8 EN MACRÓFAGOS



**Memoria presentada para optar al título de Doctor
por la Universidad de Granada**

**Salvador Agustín Romero Pinedo
Granada, 2023**

Directora de Tesis: Ana C. Abadía Molina

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Salvador Agustín Romero Pinedo
ISBN: 978-84-1195-293-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92294>

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	7
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	21
1. Monocitos. Características generales, tipos, origen y diferenciación a macrófago	25
2. Macrófagos, tipos y funciones asociadas	28
3. Fagocitosis, maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma	31
3.1. Detección del elemento a fagocitar	31
3.2. Activación del proceso de internalización y formación del fagosoma	33
3.3. Maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma	37
4. Mecanismos microbicidas en macrófagos	39
4.1. Complejo enzimático NOX2 en fagocitos. Subunidades, vías de activación y ensamblaje	39
4.1.1. Subunidades de membrana. Estructura y características generales	40
4.1.2. Subunidades citosólicas. Estructura y características generales	41
4.1.3. Vías de activación y ensamblaje de NOX2	44
4.1.3.1. Fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana	44
4.1.3.2. Activación de Rac-GTPasas	49
4.1.3.3. Movilización de subunidades citosólicas a la membrana y ensamblaje de NOX2	50
4.2. Óxido nítrico sintasa inducible	53
4.2.1. Expresión de iNOS	53
4.2.2. Estructura de iNOS y producción de NO	55
5. Moléculas de la familia del SLAM	57
5.1. Características generales	57
5.2. Localización cromosómica y patrón de expresión	59
5.3. Organización estructural	62
5.4. Ligandos	64
5.4.1. Interacción endofílica	64
5.4.2. Interacción xenofílica	64
5.5. Señalización celular	65
5.5.1. Señalización a través de SAP	66
5.5.2. Señalización a través de EAT-2 y ERT	68

5.6. Funciones biológicas de los miembros de la familia del SLAM frente a bacterias patógenas en macrófagos	69
5.6.1. SLAMF1	69
5.6.2. SLAMF2	70
5.6.3. SLAMF5	70
5.6.4. SLAMF9	71
5.7. SLAMF8	71
AIMS	75
OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS	83
1. Ratones: desarrollo y mantenimiento	85
2. Genotipado de ratones	85
2.1. Obtención de ADN genómico	85
2.2. PCR de ADN genómico y visualización de los fragmentos amplificados en gel de agarosa	87
3. Células	88
3.1. Macrófagos peritoneales de ratón	88
3.1.1. Aislamiento de los pMφ	88
3.1.2. Análisis del fenotipo de la población leucocitaria del peritoneo	88
3.1.3. Cultivo de los pMφ	89
3.2. RAW264.7	90
3.3. THP-1	90
4. Transfecciones celulares para la sobreexpresión de SLAMF8	90
4.1. Sobreexpresión de SLAMF8 murino en RAW264.7	90
4.1.1. Determinación de la tolerancia a G-418 en RAW264.7	91
4.1.2. Metodología de transfección en RAW264.7 y selección clonal	92
4.1.3. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7	93
4.2. Sobreexpresión de SLAMF8 humano en THP-1	95
4.2.1. Determinación de la tolerancia a Zeocina™ en THP-1	95
4.2.2. Metodología de transfección en THP-1 y selección clonal	96
4.2.3. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en THP-1 mediante citometría de flujo	96
5. Modelo de diferenciación <i>in vitro</i> de THP-1 a los subtipos de macrófagos M1 y M2	97
6. Cepas bacterianas	98

7. Reactivos de pretratamiento y activación celular	98
8. Modelo de infección <i>in vitro</i> de macrófagos con <i>S. typhimurium</i>	99
9. Citometría de flujo	99
10. Anticuerpos	101
11. <i>Western blot</i>	102
11.1. Obtención de extractos totales	102
11.2. Obtención de extractos citosólicos y de membrana	102
11.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	103
11.4. Transferencia húmeda a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	103
11.5. <i>Immunoblotting</i> y revelado de proteínas	104
12. Medida de la producción de anión superóxido	104
13. Medida de la producción de NO	105
14. Microscopía láser confocal	106
14.1. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7	106
14.2. Análisis de la polimerización de actina en pMφ. Tinción de F-actina por faloidina-Tetrametilrodamina-Isotiocianato (TRITC)	106
14.3. Análisis de la colocalización de Rab5, Rab7 y p47 ^{phox} con <i>S. typhimurium</i> -GFP en pMφ	107
14.4. Análisis de la fagocitosis de <i>S. typhimurium</i> -GFP en pMφ	107
15. Extracción de ARN total y análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR y RT-qPCR	109
15.1. Extracción de ARN total	109
15.2. Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR	109
15.3. Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR	111
16. Infección <i>in vivo</i> con <i>S. typhimurium</i> : extracción de células, órganos y determinación de la actividad microbicida	112
17. Análisis estadístico	113
RESULTADOS	115
1. Estudio de la modulación de SLAMF8 en las vías de activación y ensamblaje de NOX2, en macrófagos peritoneales de ratón	117
1.1. Análisis de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47 ^{phox} y p40 ^{phox} a través de la activación directa e indirecta de la PKC, y participación de p38 y ERK1/2 MAPK	117
1.2. Análisis de la activación de NOX2 y producción de anión superóxido a través de PKC, p38 MAPK y PI3K empleando inhibidores específicos	119

1.2.1. Análisis de la producción de anión superóxido y de las vías de activación PKC, p38 MAPK y PI3K bajo la estimulación con PMA	119
1.2.2. Análisis de las vías de activación PKC, p38 MAPK y PI3K bajo la estimulación con LPS puro	122
1.3. Análisis de la movilización de las subunidades citosólicas p47 ^{phox} , p40 ^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana	125
2. Estudio del efecto de SLAMF8 en la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos peritoneales de ratón	127
3. Estudio de la modulación de SLAMF8 en la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS, en un modelo de infección con <i>Salmonella in vitro</i>	129
3.1. Análisis de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47 ^{phox} y p40 ^{phox} , inducción de iNOS, y participación de p38 y ERK1/2 MAPK en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	130
3.2. Análisis de la activación de NOX2 e iNOS a través de las vías PKC, p38 MAPK y PI3K en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	132
3.3. Análisis de la progresión del fagosoma mediante la determinación del reclutamiento de las GTPasas Rab5 y Rab7, y de la subunidad p47 ^{phox} hacia el SCV	137
3.4. Análisis de la expresión de <i>il-6</i> en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	140
4. Estudio de la expresión de <i>tlrs</i> y <i>Slamf9</i> en pMφ deficientes en SLAMF8 infectados con <i>S. typhimurium</i>	141
5. Estudio de la función de SLAMF8 sobre la vía de activación Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	144
6. Estudio del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de macrófagos de ratón	147
6.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de NOX2, y de p38 y ERK1/2 MAPK, bajo la estimulación con PMA y LPS puro	148
6.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de NOX2, iNOS, p38 y ERK1/2 MAPK, y la expresión de <i>il-6</i> bajo la infección con <i>S. typhimurium</i>	149
7. Estudio de la implicación de SLAMF8 en la capacidad de eliminación de <i>S. typhimurium in vivo</i>	152
8. Estudio de la función de SLAMF8 en macrófagos humanos	155
8.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en monocitos humanos sobre la activación de NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK	155
8.2. Estudio de la expresión de SLAMF8 en los subtipos de macrófagos M1 y M2	157
DISCUSIÓN	161
1. SLAMF8 como regulador negativo de las vías de activación y ensamblaje de NOX2 en pMφ de ratón	163

1.1. Función moduladora de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 a través de vías directas e indirectas de la PKC. Papel regulador negativo de SLAMF8 sobre la PI3K	164
1.2. Función moduladora de SLAMF8 sobre la movilización de las subunidades citosólicas p47 ^{phox} , p40 ^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana	169
2. Efecto de la acción de SLAMF8 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina en pMφ de ratón	171
3. Papel de SLAMF8 sobre los mecanismos microbicidas y de sus vías de activación, en un modelo de infección con <i>Salmonella in vitro</i>	173
3.1. Confirmación de SLAMF8 como regulador negativo a través de la PI3K en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	175
3.2. Papel de SLAMF8 sobre la progresión del SCV	177
4. Papel de SLAMF8 en la regulación de la expresión de <i>tlrs</i> , <i>Slamf9</i> e <i>il-6</i> , en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	179
5. Función moduladora de SLAMF8 sobre la vía de activación Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, en pMφ infectados con <i>S. typhimurium</i>	181
6. Papel de SLAMF8 en la capacidad microbicida de <i>S. typhimurium in vivo</i>	184
7. Estudio del papel de SLAMF8 en macrófagos humanos	185
8. SLAMF8 como posible diana terapéutica. Tratamiento de estados inflamatorios severos o no resueltos e implicación en cáncer	186
CONCLUSIONS	189
CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFÍA	197
PUBLICACIÓN	219

ABSTRACT

Macrophages (M ϕ) are innate immune cells and main sentinels responsible for defense against microorganisms. In addition to being essential in the elimination of microorganisms through phagocytosis and their microbicidal mechanisms, they are powerful immunomodulatory cells capable of producing cytokines and presenting antigens, key processes in the immune response developed by this cell type.

Phagocytosis is a process initiated by pattern recognition receptors (PRRs) located in these cells, which is followed by a series of cellular events involved in the elimination of the phagocytosed microorganism. These events would be the microbicidal mechanisms, which in turn are highly regulated to avoid damage to the host cell. The regulation of these mechanisms occurs through different activation pathways, which may be initiated by signal transduction mediated by the participation of other receptor molecules.

The SLAM family consists of 9 membrane receptors. Initially described as adhesion molecules responsible for the immunological synapse in T and NK cells, they act as immunomodulators of diverse functions at the innate and adaptive level, control the differentiation and lineage of hematopoietic cells, and also regulate microbicidal mechanisms in M ϕ , neutrophils and dendritic cells (DC).

SLAMF8 is one of the last described members of this family, its expression is induced by stimulation with Gram-negative and Gram-positive bacteria, LPS and IFN γ in neutrophils, M ϕ and DC. In addition, its expression has been described in B cells and a low percentage of T cells, with no ascribed function.

Previous studies to this doctoral thesis have shown that SLAMF8 acts as a negative regulator of NADPH oxidase (NOX2) activation through PKC δ and probably on the p38 MAPK pathway in mouse M ϕ , as well as having a possible involvement in the inflammatory response by negatively regulating the migration of M ϕ , among other cells, to the inflammatory focus.

Given the described role of this SLAM family member on the negative regulation of NOX2 and its possible function on the inflammatory response, we decided to analyze in depth the effect of SLAMF8 on the regulation of these mechanisms in M ϕ .

First, we performed a study of NOX2 activation through direct and indirect PKC pathways in SLAMF8 mouse deficient M ϕ (SLAMF8 $^{-/-}$) compared with M ϕ from the wild-type strain (WT or SLAMF8 $^{+/+}$). For this study cells were stimulated with PMA and pure LPS, and we employed

specific inhibitors for PKC-, p38- MAPK and PI3K-mediated activation pathways. The results confirmed that, in the absence of SLAMF8, the activation of NOX2 through PCK was increased in the p47^{phox} and p40^{phox} subunits, detecting also an increased activation of p38 and ERK1/2 MAPK. The study with inhibitors confirmed these results, and furthermore not only showed negative modulation of NOX2 by SLAMF8 through these pathways, but also that specific inhibition of PI3K equalized the production of reactive oxygen species (ROS) between samples. Moreover, with PI3K inhibitor the observed differences in NOX2 activation pathways disappeared, equalizing the level of activation between M ϕ SLAMF8^{-/-} and WT. Furthermore, analysis on the mobilization of NOX2 cytosolic subunits and the reorganization of the actin cytoskeleton showed that, SLAMF8 also negatively regulates these processes, probably through its action on PI3K.

These results indicated that SLAMF8 effects negatively regulate processes involved in the elimination of microorganisms, therefore we analyzed the consequence that this receptor could have on the progression of severe infections. For this purpose, we used an *in vitro* *Salmonella typhimurium* infectious model. The results showed that SLAMF8 was able to negatively regulate the microbicidal mechanisms of NOX2 and iNOS, and their activation pathways in M ϕ , confirming again by the use of inhibitors that, the absence of SLAMF8 affects the activation pathway on these mechanisms by PI3K. In this study, we also observed that SLAMF8 affected the modulation process of *S. typhimurium* on NOX2 and iNOS activation on the SCV (*Salmonella*-containing vacuole), analyzing the activation of the enzymes at different SCV maturation times: early, intermediate and late.

In order to confirm the modification in the composition of the SCV at different stages of maturation, we analyzed the recruitment of Rab5, Rab7 and p47^{phox} to the SCV by laser confocal microscopy. According to the results obtained, it was concluded that the absence of SLAMF8 generated a greater fusion of phagosomes with lysosomes and an altered progression of the SCV, which probably generated an impairment in the capacity of *S. typhimurium* to control the progression of the SCV, essential for the maintenance and proliferation of the bacteria. All these lead us to conclude that SLAMF8 is able to negatively modulate the activation of microbicidal mechanisms through its action on PI3K. We believe that the intervention negatively modulates the PKC and PI3K feedback loop, since PI3K inhibition completely eliminates the observed differences between SLAMF8^{-/-} and WT M ϕ stimulated with bacteria, PKC agonists or pure LPS. This is consistent with the fact that M ϕ SLAMF8^{-/-} M ϕ exhibit increased polarization and migration, mechanism also controlled via the PKC-PI3K feedback loop.

Considering that some of the SLAM family receptors can modulate M ϕ activation through their association with Toll-like receptors (TLRs), the expression of TLRs involved in *Salmonella* clearance was analyzed. The results showed a slight significantly higher increase in the expression of *tlr2* and *tlr4* in the absence of SLAMF8. Although, we do not believe that this small difference is the cause of the observed phenotype, it could also contribute to it. We also analyzed the expression of *Slamf9*, a member of the family implicated in the elimination of this microorganism, since has been described a combined action with SLAMF8 in a model of sepsis with LPS, through modulation of the expression of TLR4. We found no differences in the expression of *Slamf9* in the model of infection with *S. typhimurium in vitro*. On the other hand, we did observe that, in the absence of SLAMF8, the expression of the cytokine *il-6* was increased in this model of infection, which indicated that SLAMF8 effectively modulates the inflammatory response in M ϕ and therefore its action is effective during infectious processes.

Next, the role of SLAMF8 on the Src kinase and SHP-1 phosphatase activation pathway was analyzed due to its involvement in NOX2 activation processes and intervention in the activation mechanisms for the elimination of microorganisms. The results showed a greater activation of Src kinases and a detriment in the activation of SHP-1 phosphatase in the absence of SLAMF8, under the model of infection with *S. typhimurium in vitro*. It was observed that IFN γ treatment in SLAMF8^{-/-} M ϕ already increases Src activation, and furthermore, that under *S. typhimurium* stimulation further increased Src kinase activation accompanied by a detriment in SHP-1. This fact may be due to the increase in ROS production described as an activator of Src and inhibitor of SHP1. Hence, in conclusion, SLAMF8 also modulates the priming or initiation of M ϕ activation, since we observed that treatment with LPS or IFN γ already shows differences in their activation.

The role of SLAMF8 on NOX2 and iNOS microbicidal mechanisms activation in mouse M ϕ was confirmed by murine SLAMF8 overexpression experiments in the RAW264.7 cell line, in which a phenotype opposite to that observed in SLAMF8 deficient M ϕ was obtained.

Subsequently, confirmation that SLAMF8 acts as regulator of microbicidal mechanisms was obtained by studying SLAMF8 on the microbicidal capacity of *S. typhimurium in vivo*. The results indicated that SLAMF8-deficient mice had a higher microbicidal capacity than WT mice, and that in the absence of SLAMF8 there is a reduction in the proliferative capacity of *S. typhimurium*. These results are probably produced by the greater induction of iNOS and NOX2 detected in SLAMF8^{-/-} mice, which consequently, would generate less phagosome acidification,

as already observed in SLAMF8^{-/-} Mφ, which would prevent accelerated acidification of the SCV, an effect used by the bacterium for its replication.

Finally, given its function in mouse Mφ, the role in human Mφ was analyzed. First, it was determined by human SLAMF8 overexpression experiments in the THP-1 cell line that the effect of SLAMF8 on the regulation of NOX2 activation in human monocytes was similar to that observed in mouse Mφ. Second, given the plasticity of functions associated with Mφ, SLAMF8 expression was analyzed in human Mφ M1 and M2 subtypes. The results showed that SLAMF8 was expressed in both Mφ subtypes, possibly indicative of a possible involvement of SLAMF8 in the modulation of pro- and anti-inflammatory responses.

In summary, this study performs an in-depth analysis of the role of SLAMF8 in Mφ functionality. Thanks to the set of results obtained, it is confirmed that SLAMF8 is able to negatively regulate activation processes *in vitro*, through its negative regulating action on PI3K in the PKC and PI3K feedback loop. Furthermore, our results indicate that SLAMF8 is capable of negatively modulating microbicidal mechanisms both *in vitro* and *in vivo*, and that its function in human may be similar to that found in mouse. This raises the possibility of its use as a therapeutic target through its intervention for the treatment of severe or unresolved inflammatory states.

RESUMEN

Los macrófagos (M ϕ) son células inmunitarias innatas y principales centinelas encargados de la defensa frente a microorganismos. Además de ser esenciales en la eliminación de éstos a través de la fagocitosis y sus mecanismos microbicidas, son potentes células inmunomoduladoras capaces de producir citoquinas y presentar antígenos, procesos clave en la respuesta inmunitaria desarrollada por este tipo celular.

La fagocitosis es un proceso iniciado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) situados en estas células, al que le siguen una serie de eventos celulares implicados en la eliminación del microorganismo fagocitado. Estos eventos serían los mecanismos microbicidas, los cuales a su vez se encuentran altamente regulados para evitar daños en la célula hospedadora. La regulación de estos mecanismos se produce a través de diferentes vías de activación, que pueden estar iniciadas por la transducción de señales mediadas por la participación de otras moléculas receptoras.

La familia del SLAM está constituida por 9 receptores de membrana. Descritos inicialmente como moléculas de adhesión responsables de la sinapsis inmunológica en células T y NK, actúan como inmunomoduladores de diversas funciones a nivel innato y adaptativo, controlan la diferenciación y linaje de células hematopoyéticas, y además regulan mecanismos microbicidas en M ϕ , neutrófilos y células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*).

SLAMF8 es de los últimos miembros descritos de esta familia. Su expresión se induce mediante la estimulación con bacterias Gram negativas y positivas, LPS e IFN γ en neutrófilos, M ϕ y DC. Además, se ha descrito su expresión en células B y un bajo porcentaje de células T, sin función adscrita.

Estudios previos a esta tesis doctoral, han mostrado que SLAMF8 actúa regulando negativamente la activación de la NADPH oxidasa (NOX2) a través de la PKC δ y probablemente sobre la vía p38 MAPK en M ϕ de ratón, además de tener una posible participación en la respuesta inflamatoria por regular de manera negativa la migración de M ϕ , entre otras células, al foco inflamatorio.

Dado el papel descrito de este miembro de la familia del SLAM sobre la regulación negativa de NOX2 y su posible función sobre la respuesta inflamatoria, decidimos analizar en profundidad el efecto de SLAMF8 sobre la regulación de estos mecanismos en M ϕ .

En primer lugar, se realizó un estudio sobre la activación de NOX2 a través de vías directas e indirectas de PKC en Mφ de ratones deficientes para SLAMF8 (SLAMF8^{-/-}) en comparación con Mφ de la cepa salvaje (WT, *wild type* o SLAMF8^{+/+}). Para este estudio las células fueron estimuladas con PMA y LPS puro, y empleamos inhibidores específicos para las vías de activación mediadas por PKC, p38 MAPK y PI3K. Los resultados confirmaron que en ausencia de SLAMF8 la activación de NOX2 a través de PCK estaba incrementada en las subunidades p47^{phox} y p40^{phox}, detectando también una mayor activación de p38 y ERK1/2 MAPK. El estudio con inhibidores confirmó estos resultados, y además no solo mostró la modulación negativa de NOX2 por SLAMF8 a través de estas vías, sino que la inhibición específica de PI3K igualaba la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) entre las muestras. Es más, con el inhibidor de la PI3K las diferencias observadas en las vías de activación de NOX2 desaparecían, igualando el nivel de activación entre Mφ SLAMF8^{-/-} y WT. Además, el análisis sobre la movilización de las subunidades citosólicas de NOX2 y la reorganización del citoesqueleto de actina, nos mostró que SLAMF8 también regula negativamente estos procesos probablemente a través de su acción sobre la PI3K.

Debido a que los resultados indicaron que SLAMF8 actuaba regulando negativamente procesos implicados en la eliminación de microorganismos, se analizó el efecto que podría tener este receptor en la progresión de infecciones graves. Para esto, empleamos un modelo infeccioso por *Salmonella typhimurium in vitro*. Los resultados mostraron que SLAMF8 era capaz de regular negativamente los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS y sus vías de activación en Mφ, confirmando de nuevo por el empleo de inhibidores que, la ausencia de SLAMF8 afecta a la vía de activación sobre estos mecanismos por la PI3K. En este estudio además observamos que SLAMF8 afectaba al proceso de modulación que ejerce *S. typhimurium* sobre la activación de NOX2 e iNOS en el SCV (*Salmonella-containing vacuole*), analizando la activación de las enzimas a diferentes tiempos de maduración del SCV: temprano, intermedio y tardío.

Con objeto de confirmar la modificación en la composición del SCV en sus diferentes estadios de maduración, analizamos el reclutamiento de Rab5, Rab7 y p47^{phox} hacia el SCV mediante microscopia láser confocal. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que la ausencia de SLAMF8 generaba una mayor fusión de fagosomas con lisosomas y una progresión alterada del SCV, lo que probablemente generaba un detrimento de *S. typhimurium* en el control de la progresión del SCV, fundamental para el mantenimiento y proliferación de la bacteria. Todo esto nos lleva a concluir que SLAMF8 es capaz de modular negativamente la activación de mecanismos microbicidas a través de su acción sobre la PI3K. Creemos que la intervención modula negativamente el bucle de retroalimentación de la PKC y PI3K, ya que la

inhibición de PI3K elimina completamente las diferencias observadas entre los M ϕ SLAMF8^{-/-} y WT, estimulados tanto con bacteria como con agonistas de la PKC o LPS puro. Esto concuerda con el hecho de que los M ϕ SLAMF8^{-/-} presenten una mayor polarización y migración, mecanismo que está controlado también mediante el bucle de retroalimentación PKC-PI3K.

Teniendo en cuenta que algunos de los receptores de la familia del SLAM pueden modular la activación en M ϕ por medio de su asociación con los receptores tipo Toll (TLRs), se analizó la expresión de TLRs implicados en la eliminación de *Salmonella*. Los resultados mostraron un ligero aumento significativamente mayor en la expresión de *tlr2* y *tlr4* en ausencia de SLAMF8. No creemos que esta pequeña diferencia sea causante del fenotipo observado, aunque también podría contribuir a ello. También analizamos la expresión de *Slamf9*, miembro de la familia implicado en la eliminación de este microorganismo, ya que se ha descrito una acción conjunta de éste con SLAMF8 en un modelo de sepsis con LPS, mediante la modulación de la expresión de TLR4. No encontramos diferencias en la expresión de *Slamf9* en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*. En cambio, sí se observó que, en ausencia de SLAMF8 estaba incrementada la expresión de la citoquina *il-6* bajo este modelo de infección, lo que indicaba que, efectivamente SLAMF8 modula la respuesta inflamatoria en M ϕ y por tanto su acción es efectiva durante procesos infecciosos.

A continuación, se analizó el papel de SLAMF8 sobre la vía de activación Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, por su implicación en procesos de activación de NOX2 e intervención en la activación de mecanismos para la eliminación de microorganismos. Los resultados mostraron una mayor activación de Src quinasas y un detrimento en la activación de la fosfatasa SHP-1 en ausencia de SLAMF8, bajo el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*. Se observó que el tratamiento con IFN γ en los M ϕ SLAMF8^{-/-} ya incrementa la activación de Src y, además, que bajo el estímulo de *S. typhimurium* incrementaba aún más la activación de Src quinasas acompañado de un detrimento en SHP-1. Creemos que esto es debido al incremento en la producción de ROS, descrito como activador de Src e inhibidor de SHP1. Todo esto nos lleva a concluir que SLAMF8 también modula el cebado o inicio de activación de los M ϕ , ya que observamos que el tratamiento con LPS o IFN γ ya muestra diferencias en la activación de los mismos.

La función de SLAMF8 sobre la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS y de sus vías de activación en M ϕ de ratón, fueron confirmados por medio de experimentos de sobreexpresión de SLAMF8 murino en la línea celular RAW264.7, en los que se obtuvo un fenotipo contrario al observado en M ϕ deficientes en SLAMF8.

Posteriormente, la confirmación de que SLAMF8 presentaba un papel sobre la regulación de los mecanismos microbicidas, se obtuvo por medio del estudio de SLAMF8 sobre la capacidad microbicida de *S. typhimurium in vivo*. Los resultados indicaron que ratones deficientes en SLAMF8 presentaban una mayor capacidad microbicida que los WT, y que en ausencia de SLAMF8 hay una reducción de la capacidad proliferativa de *S. typhimurium*. Estos resultados probablemente sean producidos por la mayor inducción de iNOS y NOX2 detectada en los ratones SLAMF8^{-/-} que, en consecuencia, generarían una menor acidificación del fagosoma ya observada en los Mφ SLAMF8^{-/-}, que impediría la acidificación acelerada del SCV, efecto utilizado por la bacteria para su replicación.

Finalmente dada su función en Mφ de ratón, se analizó su posible papel en Mφ humanos. En primer lugar, se determinó por medio de experimentos de sobreexpresión de SLAMF8 humano en la línea celular THP-1, que el efecto de SLAMF8 sobre la regulación de la activación de NOX2 en monocitos humanos era similar al observado en Mφ de ratón. En segundo lugar, dada la plasticidad de funciones asociada a los Mφ, se analizó la expresión de SLAMF8 en los subtipos de Mφ M1 y M2 en humano. Los resultados mostraron que SLAMF8 se expresaba en ambos subtipos de Mφ, lo que posiblemente era indicativo de una posible implicación de SLAMF8 en la modulación de respuestas pro- y anti-inflamatorias.

En resumen, este estudio hace un análisis en profundidad del papel de SLAMF8 en la funcionalidad de los Mφ. Gracias al conjunto de resultados obtenidos, se confirma que SLAMF8 es capaz de regular negativamente procesos de activación *in vitro*, y que lo hace a través de su acción moduladora negativa sobre la PI3K en el bucle de retroalimentación de la PKC y PI3K. Además, nuestros resultados indican que SLAMF8 es capaz de modular negativamente mecanismos microbicidas tanto *in vitro* como *in vivo*, y que su función en humano puede ser similar a la encontrada en ratón. Esto plantea la posibilidad de su uso como diana terapéutica a través de su intervención para el tratamiento de estados inflamatorios severos o no resueltos.

ABREVIATURAS

•O₂⁻: Anión superóxido

•OH: Radical hidroxilo

6R-H₄B: (6R)-5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina

AA: Aminoácido

AD: Dominio de Activación (*Activation Domain*)

AIR: Región de Autoinhibición (*Auto-Inhibitory Region*)

Ala: Alanina (*Alanine*)

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

Arg: Arginina (*Arginine*)

Asp: Aspartato (*Aspartate*)

BGH: Hormona de Crecimiento Bovina (*Bovine Growth Hormone*)

BIM-1: Bis-Indol-Maleimida I

BLAME: Activador de Linfocitos B Expresado en Macrófagos (*B-Lymphocyte Activator Macrophage Expressed*)

BSA: Albúmina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*)

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

Células T_{FH}: Células T Foliculares Colaboradoras

CLRs: Receptores de Lectina tipo C (*C-type Lectin Receptors*)

CMV: Citomegalovirus (*Cytomegalovirus*)

CP: Región Citoplasmática

D.O.: Densidad Óptica

DAG: Diacilglicerol (*Diacylglycerol*)

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño (*Damage AMPs*)

DC: Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

DEPC: Dietil Pirocarbonato (*Diethyl Pyrocarbonate*)

EAE: Encefalomiелitis Autoimmune Experimental (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

EAT-2: Transcrito-2 asociado al sarcoma de Ewing (*Ewing's sarcoma-associated transcript-2*)

EEA1: Antígeno de Endosoma Temprano (*Early Endosome Antigen 1*)

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa expresada en endotelio (*endothelial Nitric Oxide Synthase*)

ERK: Quinasa Regulada por señales Extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinases*)

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

ES Cells: Células Madre Embrionales (*Embryonic Stem Cells*)

F4/80: Receptor de hormonas similares a mucina que contienen módulos EGF (EMR, *EGF-like Module-containing mucin-like hormone Receptor-like*)

FAD: Flavín Adenin Dinucleótido (*Flavin Adenine Dinucleotide*)

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

FcRs: Receptores para la Fracción Constante de los anticuerpos

FDC: Células Foliculares Dendríticas (*Follicular Dendritic Cells*)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein IsoTioCyanate*)

FMN: Flavín Mononucleótido (*Flavin Mononucleotide*)

GAPDH: Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GAPs: Proteínas Activadoras de GTPasas (*GTPase-activating proteins*)

GEF: Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factors*)

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

Gln: Glutamina (*Glutamine*)

Glu: Glutamato (*Glutamate*)

Gly: Glicina (*Glycine*)

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*)

GPI: Glicosilfosfatidilinositol (*Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol*)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HOCl: Ácido hipocloroso

HPRT1: Hipoxantina-Fosforribosil-Transferasa 1 (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*)

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

i. p.: Intraperitoneal

IFN- γ : Interferón γ

IgC: Dominio Inmunoglobulina Constante

IgSF: Superfamilia de las Inmunoglobulinas (*Immunoglobulin superfamily*)

IgV: Dominio Inmunoglobulina Variable

IL: Interleuquina

Ile: Isoleucina (*Isoleucine*)

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

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato (*Inositol 1,4,5-trisphosphate*)

IRF-1: Factor Regulador de IFN 1 (*Interferon Regulatory Factor 1*)

ITAMs: Motivos de Activación del Inmunoreceptor basados en Tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs*)

ITIMs: Motivos de Inhibición de Inmunoreceptor basado en Tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motifs*)

ITSM: Motivo de Cambio del Inmunoreceptor basado en Tirosina (*Intracellular Tyrosine-based Switch Motif*)

JNK: Quinasa jun N-terminal (jun NH₂-terminal kinase)

kDa: Kilodalton

LAMPs: Proteínas de Membrana Asociada a Lisosomas (*Lysosomal-Associated Membrane Proteins*)

LAT: *Linker* para la activación de células T (*Linker for activation of T cells*)

LB: Luria-Bertni Broth

LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide Binding Protein*)

Leu: Leucina (*Leucine*)

LPS: Lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide*)

LY6C: Complejo 6 del antígeno linfocitario locus C1

LY6G: Complejo 6 del antígeno linfocitario locus G6D

Lys: Lisina (*Lysine*)

Mφ: Macrófagos

MAPK: Proteína Quinasa activada por Mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MARCKS: Sustrato de Quinasa C Rico en Alanina Miristolada (*Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*)

MARCO: Receptor de Macrófagos con estructura Colagenosa (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*)

MDP: Progenitor celular de Monocitos y células Dendríticas (*Monocyte and Dendritic Cell Progenitor*)

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

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia (*Mean Fluorescence Intensity*)

m.o.i.: Índice de Multiplicidad de Infección (*Multiplicity of Infection*)

M-MDSCs: Células supresoras de estirpe mieloide monocíticas (*Monocytic Myeloid-derived Suppressor Cells*)

N₂O₃: Trióxido de dinitrógeno

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NaNO₃: Nitrato sódico

ND: No determinado

nNOS: Óxido Nítrico Sintasa expresada en neuronas (*neuronal Nitric Oxide Synthase*)

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintetas (*Nitric Oxide Synthases*)

NOX2: NADPH oxidasa

O₃: Ozono

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

ONOO⁻: Anión peroxinitrito

ORF: Marco Abierto de Lectura (*Open Reading Frame*)

PAK: Quinasa Activada por p21 (*p21-activated kinase*)

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)

pb: Pares de bases

PB1: *Phox* y *Bem1*

PBS: Tampón Fosfato Salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pDC: Células Dendríticas plasmacitoides (*plasmacytoid Dendritic Cells*)

PK1: Proteína Quinasa Dependiente de 3-fosfoinosítidos 1 (*3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1*)

PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PerCP: Proteína de clorofila peridina (*Peridinin Chlorophyll Protein*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

PKC: Proteína quinasa C (*Protein Kinase C*)

PLC γ : Fosfolipasa C γ (*Phospholipase C γ*)

PLD: Fosfolipasa D (*Phospholipase D*)

PMA: Forbol 12-Miristato 13-Acetato (*Phorbol 12-Myristate 12-Acetate*)

PMNLs: Leucocitos Polimorfonucleares (*Polymorphonuclear Leukocytes*)

pMφ: Macrófagos peritoneales

PRR: Región Rica en Prolina (*Proline-Rich Region*)

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Pattern Recognition Receptors*)

PtdIns(3,4)P₂: Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato

PtdIns(3,4,5)P₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PtdIns(4,5)P₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PtdIns: Fosfatidilinositol

PtdIns3P: Fosfatidilinositol 3-fosfato

PTEN: Fosfatasa y Homólogo de Tensina (*Phosphatase and tensin homolog*)

PTPs: Proteína Tirosina Fosfatasa (*Protein Tyrosine Phosphatases*)

PVDF: Fluoruro de Polivinilideno (*Polyvinylidene Fluoride*)

QL: Quimioluminiscencia

RDU: Unidades de Densitometría Relativa (*Relative Densitometry Units*)

RhoGDI: Inhibidor de Disociación de RhoGDP (*Rho GDP-dissociation inhibitor*)

RNS: Especies Reactivas del Nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*)

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

RT-PCR: PCR con transcripción inversa (*Reverse Transcription PCR*)

RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcripción inversa (*quantitative Reverse Transcription PCR*)

S: Serina (*Serine*)

SAP: Proteínas Asociadas a SLAM (*SLAM-Associated Protein*)

SCV: Vacuola que Contiene a *Salmonella* (*Salmonella Containing Vacuole*)

SDS: Dodecilsulfato Sódico

Ser: Serina (*Serine*)

SHIP: Inositol Fosfatasa que contiene SH2 (*SH2-containing inositol phosphatase*)

SHP-1: Fosfatasa de tirosina que contiene dominios SH2 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*)

SLAM: Moléculas de Activación de Señalización Linfocitaria (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*)

SLAMF8^{-/-}: Deficientes en SLAMF8 o *knockout*

SLAMF8^{+/+}: salvaje o *wild type*

SOD: Superóxido Dismutasa

SP: Péptido Señal

SRs: Receptores Depuradores (*Scavenger Receptors*)

T: Treonina (*Threonine*)

T3SS: Sistema de Secreción Tipo III (*Type III Secretion System*)

TAE: *Tris-Acetate-EDTA*

TAMs: Macrófagos asociados a tumor (*Tumor-Associated Macrophages*)

TGC: Tioglicolato (*Thioglycollate*)

Thr: Treonina (*Threonine*)

TLR: Receptor tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)

TM: Región Transmembrana

TPR: Repetición de TetratrípicoPéptido (*TetratrípicoPeptide Repeat*)

TRIC: Tetrametilrodamina--Isotiocianato (*Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate*)

TTBS: *Tris-Tween-Buffered-Saline*

Tyr: Tirosina (*Tyrosine*)

UFCs: Unidades Formadoras de Colonias

V: Valina (*Valine*)

Vps34: Proteína de clasificación Vacuolar 34 (*Vacuolar protein-sorting 34*)

Y: Tirosina (*Tyrosine*)

$\Delta^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete

λ : Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

Los macrófagos (Mφ) fueron descritos por el biólogo ruso Ilya (Elie) Metchnikoff en 1882 como grandes células con capacidad de comer partículas. Debido a ello, las nombró en griego como “grandes, *makro-*” y “que se alimenta, *phago*”: *makrophago*, y al proceso celular por el cual “comían”: fagocitosis¹ (**Fig. 1**).

Metchnikoff estudió sus características biológicas, sus funciones en el estado de salud del individuo y su papel como elementos cruciales dentro del sistema inmunitario innato eliminando patógenos. En 1908, fue galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina junto a Paul Ehrlich. Metchnikoff fue premiado por sus estudios relacionados con los Mφ y Paul Ehrlich por sus investigaciones sobre los anticuerpos².

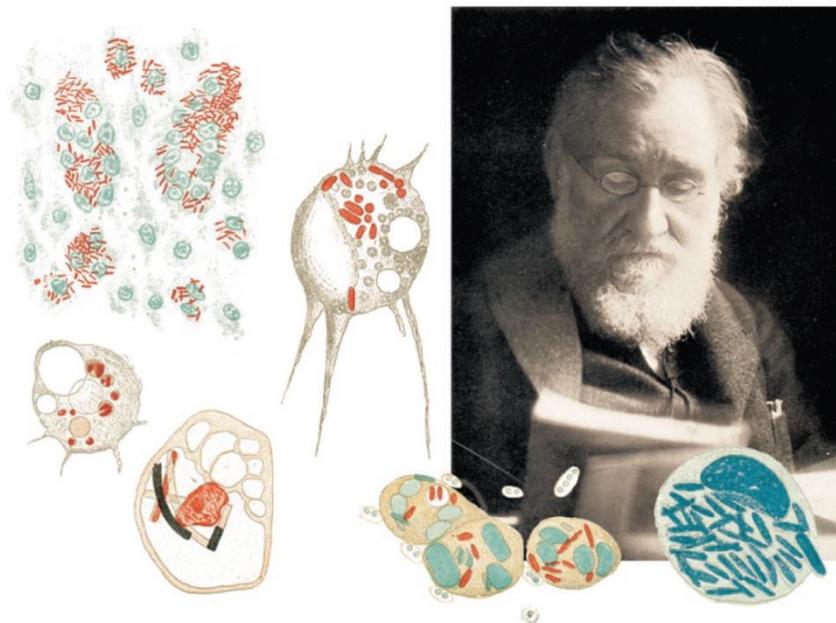


Figura 1. Elie Metchnikoff y dibujos realizados por él, mostrando la fagocitosis de bacterias por Mφ y micrófagos (neutrófilos)³. Fuente original de los dibujos: Metchnikoff (1902)⁴.

Además de la función microbicida descrita en estas células, se ha observado y demostrado que son elementos fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis del organismo por medio de la eliminación de eritrocitos, células apoptóticas y restos celulares^{5,6}.

Los Mφ son células inmunitarias de origen mieloide, que junto con los monocitos y DC se incluyen dentro del sistema fagocítico mononuclear establecido por Furth y Cohn a mediados de 1970⁷. Estos tres tipos de células se caracterizan por ser mononucleares, diferenciarse de un

progenitor mieloide común y ser fundamentales en la respuesta inmunitaria, ya que son capaces de fagocitar, producir citoquinas y presentar antígenos^{8,9}.

Clásicamente, en el sistema fagocítico mononuclear, se establecía que los Mφ presentes en los tejidos dependían de una reposición y diferenciación derivada de monocitos sanguíneos procedentes de médula ósea⁷. Actualmente, se han establecido dos grupos diferentes de Mφ presentes en los tejidos en base a su origen. El primero de ellos engloba a los Mφ de origen monocítico, los cuales provienen de monocitos de médula ósea derivados de células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*). El segundo grupo son los denominados Mφ residentes, de origen fetal, que derivan directamente de progenitores eritro-mieloides procedentes del saco vitelino o de monocitos de hígado fetal, y pueblan los tejidos durante el desarrollo embrionario¹⁰. Estudios más recientes revelan que los Mφ residentes, se auto-renuevan a partir de células de origen fetal residentes en los tejidos, mientras que los de médula ósea, son reclutados vía sanguínea a los sitios donde son necesarios para elaborar una respuesta inmunitaria, para repoblar o reparar el tejido. La clasificación de los diferentes tipos de monocitos y Mφ se realiza en base a su localización tisular y de las funciones que desempeñan¹¹.

1. Monocitos. Características generales, tipos, origen y diferenciación a macrófago

Los monocitos son un subconjunto de leucocitos agranulocitos, que constituyen el sistema fagocítico mononuclear junto a Mφ y DC. Pueden diferenciarse en tejido a Mφ en función de las circunstancias, siendo la principal función de este tipo celular, la de mediar en la defensa antimicrobiana del huésped en el sitio de infección¹².

Su tamaño oscila entre 15 y 30 μm y debido a la presencia de pseudópodos, tiene un aspecto que varía desde el redondeado al irregular. El núcleo puede ser central o excéntrico y presenta varias formas pudiendo ser redondo, oval o en forma de herradura, siendo esta última, la más característica. La cromatina es laxa y se orienta formando hileras. La relación entre el núcleo y el citoplasma es de 2:1 y su citoplasma se caracteriza por la presencia de vacuolas fagocíticas y endosomas (**Fig. 2**). En condiciones fisiológicas los monocitos constituyen entre un 2 a un 10% de los leucocitos circulantes en sangre, oscilando entre 100 a 900 células por μl de sangre en función del género y edad¹³.

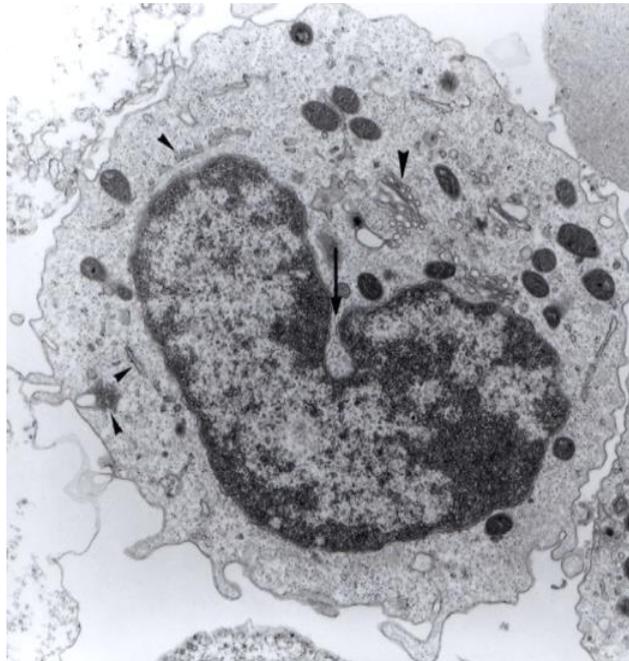


Figura 2. Imagen de un monocito obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Fotografía de un monocito que muestra las principales características de este tipo celular, como son la hendidura en el núcleo (flecha), algunos de sus elementos citoplasmáticos como el aparato de Golgi, mitocondrias y diferentes tipos de gránulos (puntas de flecha), además de proyecciones de su membrana plasmática. Aumento original 10.000X. Imagen cedida por Ana C. Abadía Molina.

Los monocitos se clasifican en base a su tamaño, circulación, expresión de receptores inmunitarios innatos y por su capacidad de diferenciación tras la estimulación con citoquinas y/o moléculas microbianas¹⁴.

Basados en su similitud a nivel de fenotipo y funciones, los monocitos de humano y ratón, pueden clasificarse en tres tipos: clásicos, intermedios y no clásicos^{15,16} (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tipos de monocitos de ratón y humanos^{15,16}.

Especie	Tipo	Marcadores fenotípicos	Funciones asociadas
Humano	Clásicos	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	Proinflamatorios y antimicrobianos.
	Intermedios	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	Proinflamatorios.
	No clásicos	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	Patrullaje y antiviral.
Ratón	Clásicos	Ly6C ⁺⁺ CD43 ⁺	Proinflamatorios y antimicrobianos.
	Intermedios	Ly6C ⁺⁺ CD43 ⁺⁺	Proinflamatorios.
	No clásicos	Ly6C ⁺ CD43 ⁺⁺	Patrullaje, respuesta temprana y reparación de tejido.

Ly6C: complejo 6 del antígeno linfocitario locus C1; **CD43:** glicoproteína de membrana, conocida como sialoforina, participa en la adhesión celular y en el tráfico de monocitos y Mφ; **CD14:** receptor del complejo de lipopolisacárido (LPS, *Lipopolysaccharide*) y de la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP, *LPS Binding Protein*); **CD16:** receptor de baja afinidad para la fracción constante de la IgG (FcγRIII).

En humano, los monocitos se dividen en base a la expresión de CD14 y de CD16 en los tipos: clásico, intermedio y no clásicos¹⁵. Los clásicos se caracterizan por una alta expresión de CD14 y ausencia de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻). El segundo tipo de monocitos en humanos, el intermedio, se caracteriza por la alta expresión de CD14 y por presentar también expresión para CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺). El último tipo, el no clásico, presenta un menor nivel expresión de CD14 y mayor para CD16 (CD14⁺CD16⁺⁺)¹⁵.

En ratón, la división de los monocitos en los tipos clásico, intermedio y no clásico, se realiza en base a la expresión de Ly6C y CD43¹⁵. Los clásicos se caracterizan por una alta expresión Ly6C y por expresar también CD43 (Ly6C⁺⁺CD43⁺). Los intermedios presentan una alta expresión de ambos marcadores (Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺). Por último, los no clásicos presentan un menor nivel de expresión de Ly6C y alto para CD43 (Ly6C⁺CD43⁺⁺)¹⁵.

En base a sus funciones y propiedades asociadas, los tipos de monocitos encontrados en humano y ratón parecen tener unas funciones similares y contribuir de una manera parecida a nivel del sistema inmunitario^{16,17}. Los monocitos del tipo clásico participarían en procesos proinflamatorios y antimicrobianos, los de tipo intermedio actuarían en procesos

inflamatorios^{18,19} y finalmente los no clásicos tendrían de manera general, funciones de patrullaje con un papel de vigilancia, revisando la presencia de daño que reparar o micropartículas dañinas que eliminar²⁰.

Los monocitos provienen del progenitor mielóide común de monocitos y DC (MDP, *Monocyte and Dendritic Cell Progenitor*) procedente de la diferenciación en médula ósea de HSC (**Fig. 3**). Una vez formados los monocitos, estos son liberados al torrente sanguíneo donde se pueden mantener patrullando, ser reclutados al sitio de infección, movilizarse a tejido para diferenciarse en Mφ específicos de tejido, o dirigirse al bazo donde se almacenarían hasta su requerimiento²¹. La movilización desde el flujo sanguíneo hasta el tejido, se realiza entre las células del endotelio de los vasos sanguíneos mediante un proceso denominado diapédesis o extravasación, en el que participan moléculas de adhesión y citoquinas²².

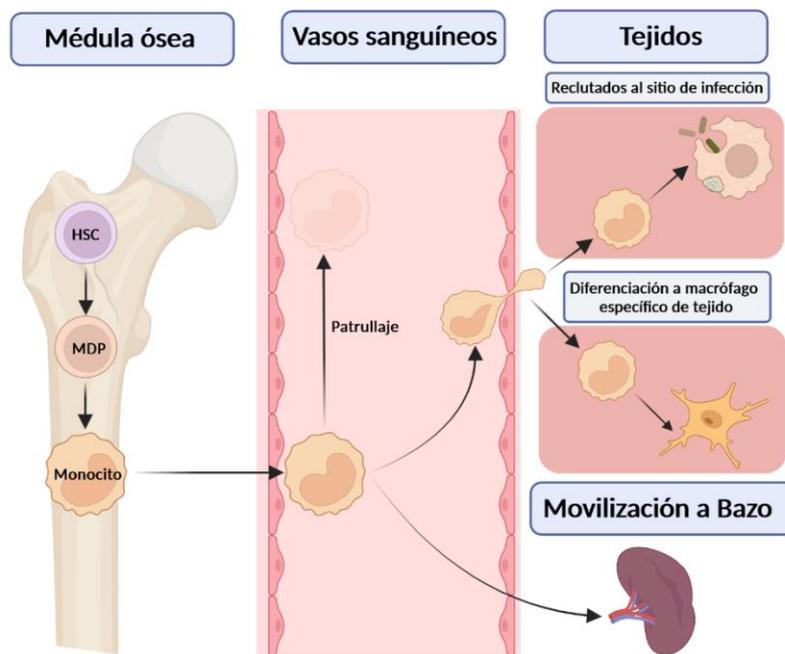


Figura 3. Esquema general de diferenciación, tráfico circulatorio y reclutamiento de Mφ de origen monocítico a sitios específicos^{14,16}. Las células madre hematopoyéticas (HSC) se diferencian en médula ósea a progenitores mieloides de monocitos y DC (MDP). Los MDP se diferencian posteriormente a monocitos, antes de incorporarse al flujo sanguíneo. Los monocitos circulantes pueden mantenerse patrullando, ser reclutados a tejidos específicos y diferenciarse a Mφ para participar en procesos de eliminación de microorganismos o ser movilizados al bazo.

2. Macrófagos, tipos y funciones asociadas

Los Mφ se caracterizan y distinguen de las DC, por la expresión conjunta y diferencial de los receptores de superficie F4/80 (ratón), CD11b, CD18 (MAC1), CD68 y de receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR). Los principales marcadores de membrana expresados tanto en Mφ humanos como de ratón, se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Marcadores de superficie celular en Mφ humanos y de ratón^{21,23}.

Marcador fenotípico	Características asociadas
CD11b	Expresado en células de origen mieloide.
F4/80 (ratón)	Expresado en la mayoría de los Mφ presentes en tejido en ratón. Expresión aumentada por IFN-γ. Su homólogo en humanos (EMR-1) se expresa en eosinófilos.
CD68	Expresado en todos los Mφ.
CSF1R	Expresado en monocitos y Mφ.
MAC2 o Galectina 3	Expresado en monocitos y Mφ.
CD11c	Expresado en células derivadas de monocitos, Mφ y DC.
Ly6G	Expresado en granulocitos. En combinación con Ly6C ayuda a determinar la proporción de granulocitos y monocitos o Mφ.
Ly6C	Expresado en monocitos y Mφ. En combinación con Ly6G ayuda a determinar la proporción de granulocitos y monocitos o Mφ.
IL-4Rα	Expresado en Mφ, pero también en linfocitos y otras células que responden a IL-4 e IL-13.
CD163	Expresado en la mayoría de los Mφ presentes en tejido.

CD11b: integrina αM (ITGAM); **F4/80:** miembro de la familia de molécula de adhesión con módulos EMR (EMR, *EGF-like Module-containing mucin-like hormone Receptor-like*) asociados a proteína G; **CD68:** glicoproteína lisosomal; **CSF1R:** receptor del factor estimulante de colonias 1 (*Colony Stimulating Factor 1*); **MAC2:** proteína de unión a galactósido; **CD11c:** integrina α X; **Ly6G:** complejo 6 del antígeno linfocitario locus G6D; **IL-4Rα:** cadena α del receptor para IL-4; **CD163:** receptor *scavenger* de TWEAK (*Tumor necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis*) para el complejo haptoglobina-hemoglobina.

La clasificación de los diferentes tipos de Mφ como ya se ha indicado, se realiza en base a su localización tisular y de las funciones que realizan.

En base a su localización tisular, nos encontramos con los siguientes Mφ específicos de tejido (**Fig. 4**): osteoclastos (hueso), Mφ alveolares e intersticiales (pulmón), histiocitos (tejido conectivo intersticial), células de *Kupffer* (hígado), microglía (cerebro), Mφ intraoculares (ojo), esplénicos (bazo), intestinales (intestino delgado y grueso), medulares y subcapsulares (ganglios linfáticos).

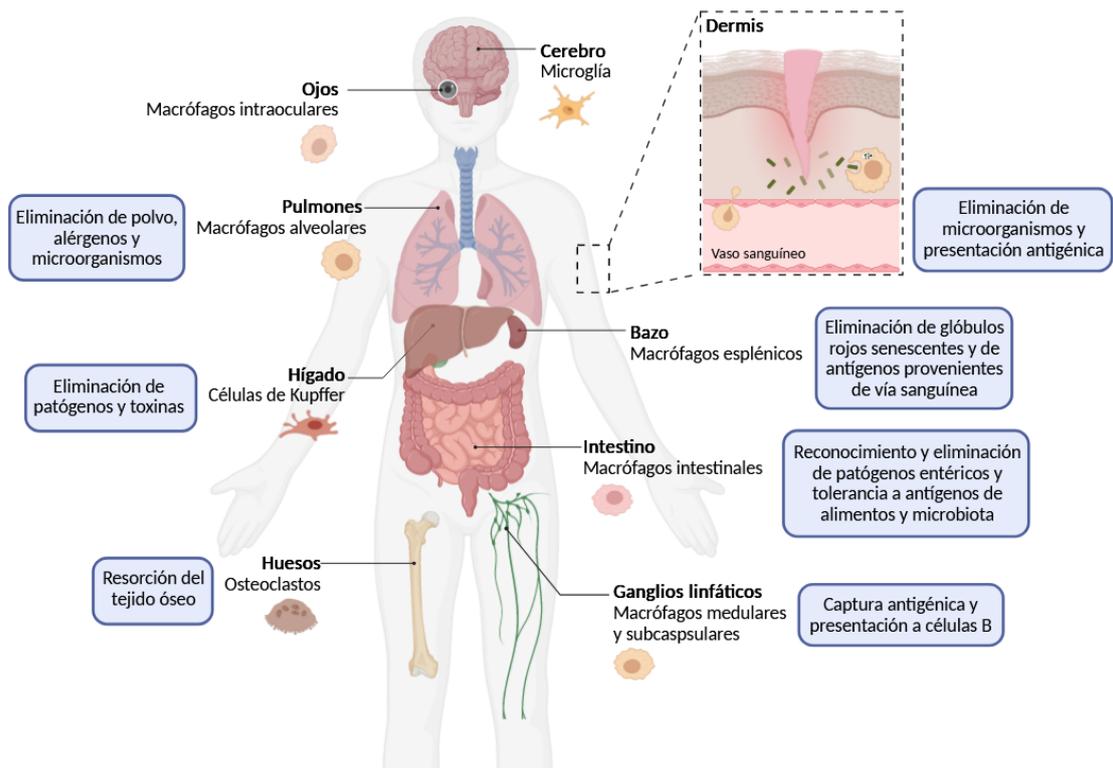


Figura 4. Esquema de la distribución de M ϕ en los tejidos y funciones principales asociadas²¹. Los monocitos circulantes del torrente sanguíneo pueden ser reclutados a diferentes localizaciones del cuerpo donde se diferencian a M ϕ específicos de tejido. La localización de las diferentes poblaciones de M ϕ tiene lugar en sitios estratégicos, donde ejercen diferentes funciones como son la de vigilancia inmunológica, fagocitosis, homeostasis celular y tisular, presentación de antígenos y supresión inmunitaria.

Los M ϕ son células centinela, y la principal función de los distintos tipos descritos es la de ingerir cuerpos extraños, microorganismos, células muertas, restos celulares, y promover el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a M ϕ para así, combatir los procesos de infección en los tejidos afectados²¹.

La clasificación de los M ϕ en base a sus funciones se basa en el perfil de genes expresados tras su exposición a citoquinas o estimulación microbiana. Por medio de este criterio se han establecido los siguientes subtipos de M ϕ : M1, M2, reguladores y asociados a tumores (TAMs, *Tumor-Associated Macrophages*). El subtipo M1 es el denominado inflamatorio, son dependientes de la activación con IFN γ y receptores tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*) y su función principal es la de participar en procesos inflamatorios ante la infección frente a bacterias, protozoos y virus, aunque también presentan un papel en la eliminación de células tumorales. Los M2 son dependientes de IL-4 e IL-13 y su función es la de ejercer funciones antiinflamatorias, participar en la reparación de tejidos y defensa frente a helmintos. El subtipo regulador, se encargaría de producir grandes cantidades de IL-10 tras la estimulación

vía FcγR, para también ejercer funciones antiinflamatorias. Por último, los del subtipo TAM suprimirían la inmunidad antitumoral y las células supresoras de origen mieloide (MDSCs, *Myeloid-derived Suppressor Cells*)²¹ estarían vinculadas a ellos, pudiendo ser sus precursoras²¹.

En base a esta clasificación, el subtipo M1 tendría un efecto inflamatorio mientras que, los subtipos M2, reguladores y asociados a tumores, tendrían funciones enfocadas a actividades inmunosupresoras²⁴. La diferenciación desde monocito a cualquiera de estos subtipos es dependiente del contexto de estimulación y dependiendo del subtipo generado, sus funciones serán la de promover o inhibir la defensa antimicrobiana, la inmunidad antitumoral y la respuesta inflamatoria²⁴.

A continuación, se explicarán las funciones ejecutadas por los Mφ en el ambiente de lucha contra los microorganismos. En un primer lugar, se detallará el mecanismo de fagocitosis y sus procesos consecuentes, como son la maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma. Posteriormente, se explicará la acción de los complejos moleculares NADPH oxidasa (NOX2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), como mecanismos microbicidas asociados a la funcionalidad de los Mφ de tipo inflamatorio.

3. Fagocitosis, maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma

La fagocitosis es un proceso celular que consiste en la detección y captación de elementos mayores de 0,5 μm pudiendo ser estos, microorganismos, sustancias extrañas, *debris* y células apoptóticas. En este proceso se definen varias fases que se pueden diferenciar en: **1)** la detección del elemento a fagocitar, **2)** activación del proceso de internalización y formación del fagosoma y **3)** maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma²⁵.

3.1. Detección del elemento a fagocitar

Es la primera fase del proceso de fagocitosis y está mediada por receptores específicos situados en las células fagocíticas. Entre estos receptores, se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) que reconocerían directamente el agente a fagocitar y receptores que lo reconocerían a través de un elemento adicional, una molécula adaptadora denominada opsonina. Las opsoninas son moléculas de naturaleza proteica, producidas por el hospedador, siendo las mejor descritas los anticuerpos y los factores del complemento²⁵.

Entre los diferentes patrones moleculares que pueden reconocer los PRRs, se encuentran los asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), asociados a daño (DAMPs, *Damage AMPs*)²⁶, asociados a microbios (MAMPs, *Microbe AMPs*) y asociados a xenobióticos (XAMPs, *Xenobiotics AMPs*)²⁷.

En base a su estructura, localización, función y especificidad de ligando, los PRRs se pueden clasificar en: TLRs, receptores de lectina tipo C (CLRs, *C-type Lectin Receptors*), receptores depuradores (SRs, *Scavenger Receptors*), receptores ausente en melanoma 2 (ALRs, *AIM2-like Receptors*), receptores tipo RIG-I (RLRs, *Retinoic acid-Inducible Gene I-Like Receptors*) y receptores tipo NOD (NLRs, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptors*)^{27,28}.

Los TLRs, CLRs y SRs, existen como proteínas transmembrana, localizándose en la superficie de las células o en compartimentos endosomales²⁹. Cuando se encuentran localizados en la superficie celular y reconocen a su ligando, activan vías de señalización que impulsan un contexto inflamatorio e inducen o favorecen la fagocitosis^{27,30}. Los TLRs tienen la capacidad de actuar bien como homodímeros o heterodímeros con otros TLRs³¹, y en algunos casos requieren de correceptores asociados a ellos para ejercer su señalización e inducir la fagocitosis por otros receptores²⁷.

Los receptores implicados en la fagocitosis no dependientes de opsoninas, se caracterizan por ser receptores para microorganismos y células apoptóticas (Tabla 3) mientras que, los receptores de fagocitosis dependientes de opsoninas, son receptores para la fracción constante de los anticuerpos (FcRs) y factores del complemento²⁵ (Tabla 4).

Tabla 3. Receptores de fagocitos no dependientes de opsoninas y ligandos asociados^{25,32-36}.

Frente a microorganismos			
Tipo TLRs			
Nombre	Correceptor	Ligando	Ejemplos de reconocimiento
TLR1/TLR2	CD14/GD1a	Subunidad B de la enterotoxina termolábil	<i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i>
	CD14/CD36	Lipomanano y lipoarabinomanano	<i>Mycobacterium</i>
	Desconocido	Porinas	<i>Neisseria</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
TLR2/TLR6	RP105/CD14/CD36	Diacilipopéptidos	<i>Mycoplasma</i>
	CD14/CD36/MBL	Ácido lipoteicoico	Bacterias Gram positivas
	CD14	Glucuronoxilomanano	<i>C. gattii</i>
	CD14/Dectin-1	Fosfolipomanano	<i>C. albicans</i>
		Zyosan	<i>S. cerevisiae</i>
	No presenta	Lipopéptido-fosfoglicano	<i>E. histolytica</i>
	CD14	Glicoproteína B	Citomegalovirus
	Desconocido	Núcleo y proteína NS3 del virus de la hepatitis C	Virus de la hepatitis C
TLR2	CD14	Peptidoglicano	<i>Staphylococcus</i>
		Lipoarabinomanano	<i>Mycobacterium</i>
TLR4	CD14	Lipopolisacárido	<i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>H. influenzae</i>
TLR5	No presenta	Flagelina	<i>P. aeruginosa</i>
Tipo CLR			
Nombre		Ligando	Ejemplos de reconocimiento
Dectin-2		α -Mananos	<i>H. alvei</i> , <i>E. coli</i>
Dectin-3		Glucuronoxilomanano	<i>C. gattii</i> , <i>C. neoformans</i>
Mincle		Glicolípidos	<i>K. pneumoniae</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i>
DC-SIGN		Manosa, glicanosfucosilados α 1-3 y α 1-4 y N-Acetilglucosamina	<i>H. pylori</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>E. coli</i> K12, <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
MGL		Galactosa y N-Acetilgalactosamina	<i>S. aureus</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>E. coli</i>
Tipo SRs			
Nombre		Ligando	Ejemplos de reconocimiento
SR-A		Ácido lipoteicoico	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i>
		Lipopolisacárido	<i>N. meningitidis</i>
SR-A6 (MARCO)		Lipopolisacárido	<i>E. coli</i>
SR-B2 (CD36)		Lipopolisacárido	<i>E. coli</i>
		Ácido lipoteicoico	<i>S. aureus</i>
SR-E2 (Dectin-1)		β -glucano fúngico y polisacáridos de levaduras	<i>C. albicans</i>
SR-E3 (Receptor de manosa, CD206)		Residuos de manosa terminales	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. carinii</i> , <i>L. donovani</i> , <i>Mycobacterium</i>
Frente a células apoptóticas			
Nombre		Ligando	
TIM-1		Fosfatidilserina	
TIM-4			
Stabilina-2			
BAI-1			
Lactadherina, integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$		Fosfatidilserina a través de moléculas puente	
CD36		Lípidos oxidados	
CD14		Fosfatidilserina	

Dectin: lectina tipo C asociada a células dendríticas (*Dendritic cell-associated C-type lectin*); **Mincle:** lectina tipo C inducible por macrófagos (*Macrophage-inducible C-type lectin*); **DC-SIGN:** Molécula de adhesión intracelular-3 de agarre no integrina específica de células dendríticas (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*); **MGL:** Lectina tipo C de Galactosa en Macrófagos (*Macrophage Galactose-type C-lectin*); **SR:** Receptor depurador (*Scavenger receptor*), **MARCO:** Receptor de Macrófagos con estructura Colagenosa (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*); **TIM:** dominios inmunoglobulina y mucina de células T (*T cell Immunoglobulin Mucin*); **BAI:** Inhibidores de Angiogénesis Cerebral (*Brain-specific Angiogenesis Inhibitor*).

Tabla 4. Receptores de fagocitosis dependientes de opsoninas y ligandos asociados²⁵

Nombre	Ligando
FcγRI (CD64)	IgG1 = IgG3 > IgG4
FcγRIIa (CD32a)	IgG3 ≥ IgG1 = IgG2
FcγRIIIa (CD16a)	IgG
FcαRI (CD89)	IgA, IgA2
CR1 (CD35)	Lectina de unión a manosa, C1q, C4b, C3b
CR3 (α _M β2, CD11b/CD18, Mac-1)	iC3b
CR4 (α _V β2, CD11c/CD18, gp190/95)	iC3b

Para el reconocimiento e inicio de un proceso de fagocitosis eficaz, se requiere de una interacción adecuada entre los receptores anteriormente indicados y sus ligandos. Esta interacción está promovida por la unión de varios receptores con su ligando y por la capacidad de difusión lateral que presentan los receptores por la membrana para su agregación y activación³⁷. La difusión lateral se ve favorecida por la capacidad que tienen otros receptores en la eliminación de glicoproteínas transmembrana grandes (mucinas, hialuronano, CD45 y CD148)³⁸ y de interacciones con componentes del citoesqueleto^{39,40}.

3.2. Activación del proceso de internalización y formación del fagosoma

El proceso de internalización es activado una vez realizada la correcta interacción entre el receptor y su ligando. Primeramente, se produce una reorganización del citoesqueleto de actina y cambios a nivel local en la membrana, generando una depresión denominada copa fagocítica. Posteriormente se induce la formación de prolongaciones de la membrana plasmática en forma de pseudópodos alrededor del elemento a fagocitar, para finalmente rodearlo por completo y formar el fagosoma en el interior de la célula²⁵.

Dependiendo del tipo de receptor que medie en el proceso, las vías de señalización implicadas en la activación de la internalización y formación del fagosoma son diferentes. Como ejemplo de fagocitosis de microorganismos, se explicará en primer lugar la inducida por receptores no dependientes de opsoninas, mediada por TLR4 a través de LPS (componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas) y, en segundo lugar, la inducida por receptores de opsoninas, mediada por FcR.

Cuando el TLR4 reconoce al LPS se activan vías de transducción de señales que, promueven una respuesta inflamatoria por la producción de citoquinas proinflamatorias e inducen la fagocitosis de microorganismos, por medio de la expresión de otros receptores de fagocitosis (Fig. 5)³⁹.

El LPS se une al TLR4 por medio del CD14, previa asociación con la proteína de unión a LPS (LBP, *LPS-Binding Protein*) y se mantiene estable gracias a la interacción con la proteína MD2⁴¹. Después, se produce una dimerización TLR4/MD2 generando un complejo en forma de M, con dos moléculas de LPS. Este complejo, presenta una región citoplasmática caracterizada por un dominio de homología Toll/IL-1R (TIR), capaz de interactuar de manera homotípica con otros dominios TIR de cuatro proteínas adaptadoras. En primer lugar, se produce la interacción con la proteína adaptadora TIRAP, la cual recluta a MyD88. Posteriormente, se unen las quinasas IRAKs que promueven el reclutamiento de TRAF6, e inicia una cascada de señalización mediada por la quinasa TAK1. Esta quinasa, es capaz de inducir la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 vía inflammasoma a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, y de TNF α , IL-6 y COX-2 por medio de los factores de transcripción CREB y AP-1, previa activación de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*): p38, ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) y JNK (*jun NH₂-terminal kinase*)⁴¹.

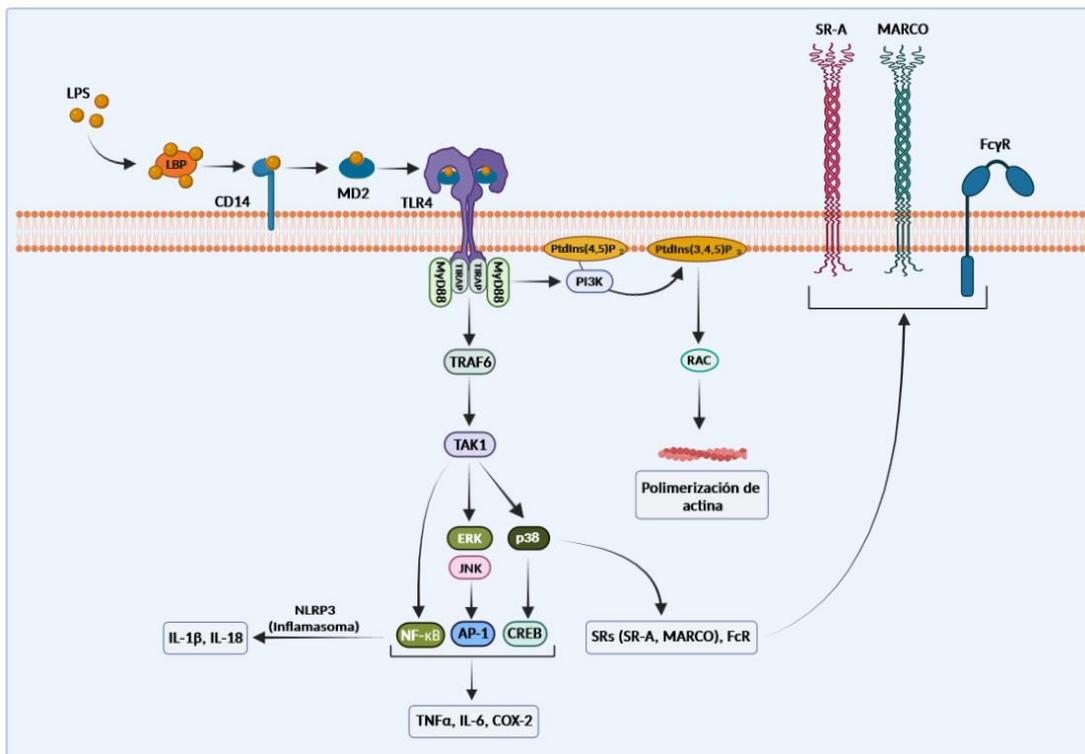


Figura 5. Esquema general de las vías de señalización activadas por el TLR4 a través del reconocimiento del LPS^{41,42}. El LPS se une previamente a la molécula LBP, esta cede el LPS al correceptor CD14 para luego por medio de la interacción con la proteína MD2 unirlo al TLR4. Esta unión, provoca la dimerización del receptor y activación de las vías de señalización que promueven la producción de citoquinas proinflamatorias y la inducción de fagocitosis, por medio de la expresión de otros receptores. La producción de TNF α , IL-6 y COX-2 está mediada por MAPK y los factores de transcripción AP-1 y CREB, y también por el factor de transcripción NF- κ B previa activación de la quinasa TAK1 por medio de la vía MyD88-TRAF6. Además, el NF- κ B induce la producción de las citoquinas IL-1 β e IL-18, por medio de la activación del inflammasoma NLRP3. La activación de p38 MAPK provoca también, la expresión de los SRs: SR-A, MARCO y de FcR, receptores que aumentan las interacciones con el microorganismo e induciría su fagocitosis.

La activación del proceso de internalización está promovido por la participación de p38 MAPK, la cual induce la expresión de los receptores SRs: SR-A y MARCO además de FcR, lo que hace aumentar el repertorio de receptores, las posibilidades de interacción del Mφ con sus ligandos y por tanto favorecer la fagocitosis⁴². La asociación de TIRAP y MyD88 en TLR4 activa la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) la cual produce fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂)⁴¹ que activaría a las Rac-GTPasas, promoviendo la reorganización del citoesqueleto de actina y formación de pseudópodos³⁹.

En el caso de la fagocitosis mediada por FcRs (**Fig. 6**) en primer lugar, se requiere de la unión de los anticuerpos a su antígeno específico y, posteriormente, del entrecruzamiento de los FcRs con la partícula opsonizada. Este entrecruzamiento induce la formación de la copa fagocítica, la cual está promovida por la quinasa Syk que se activa uniéndose a ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs*) previamente fosforilados⁴³⁻⁴⁵. A continuación, Syk fosforila y activa a proteínas implicadas en este proceso, como son: LAT (*Linker for Activation of T cells*), PI3K y fosfolipasa Cγ (PLCγ, *Phospholipase Cγ*)^{46,47}. La fosforilación de LAT induce el acoplamiento de moléculas adaptadoras Grb2 y Gab2 (*Grb2-associated binder 2*)⁴⁸. PI3K en su forma activa, fosforila PtdIns(4,5)P₂ para producir PtdIns(3,4,5)P₃ en la copa fagocítica⁴⁹⁻⁵¹. Esto provoca la activación de Rac-GTPasas y de proteínas contráctiles como la miosina, para la remodelación del citoesqueleto de actina⁵². La PLCγ activada produce a partir de PtdIns(4,5)P₂, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) que actúan como segundos mensajeros provocando la liberación de calcio y la activación de la proteína quinasa C (PKC, *Protein Kinase C*), respectivamente⁵³. Posteriormente la activación de PKC, genera la activación de otras vías implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina e impulsión de la extensión de pseudópodos, como son la activación de: ERK, p38 MAPK⁵⁴ y GTPasas de la familia Rho y Rac, estas últimas por medio del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) Vav⁵⁵.

Finalmente, comentar que la fagocitosis promovida por receptores del complemento se genera por un hundimiento de la partícula en la membrana sin generación de pseudópodos alrededor de la misma⁵⁶. En este proceso se produce la remodelación del citoesqueleto de actina, dependiente de Rho GTPasas^{57,58} y la participación de microtúbulos de tubulina⁵⁹.

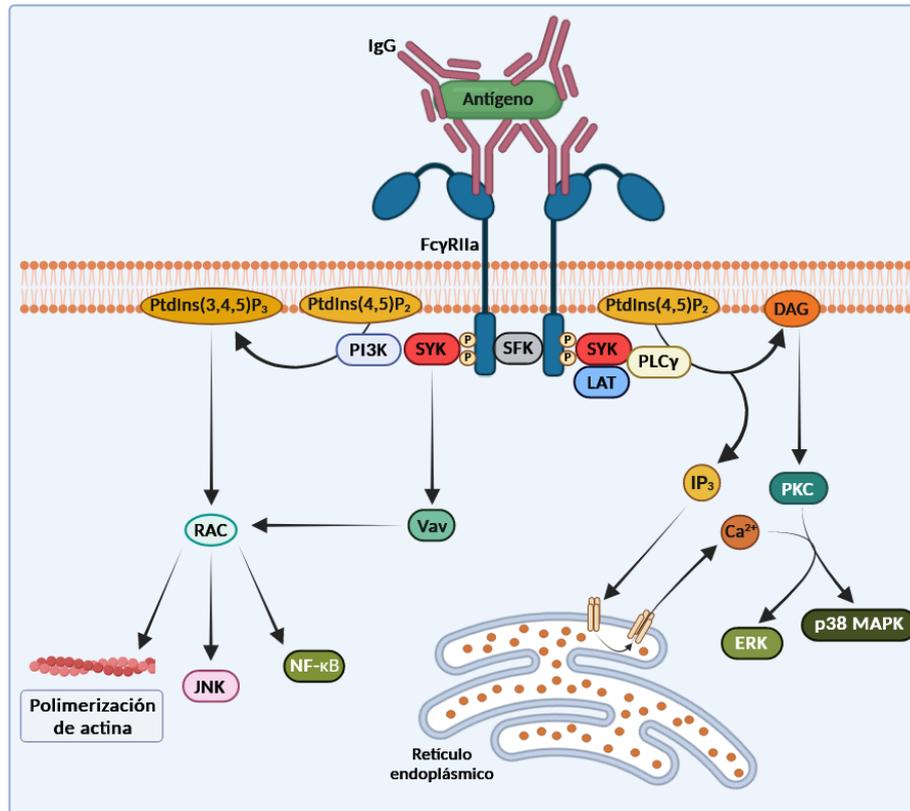


Figura 6. Esquema general de activación del proceso de internalización mediado por receptores dependientes de opsonina, FcγR²⁵. El entrecruzamiento de los receptores FcγRIIa con IgG unida al antígeno, induce la activación de las quinasas de la familia Src (SFK), que fosforilan residuos de tirosina en las secuencias ITAMs del dominio citoplasmático de los receptores Fc. A continuación, Syk es reclutada y ejerce diferentes funciones. Una de ellas es movilizarse a los ITAM fosforilados y activar por fosforilación a LAT. Después LAT interacciona con PLCγ, promoviendo la producción de IP₃ y DAG, a partir de PtdIns(4,5)P₂. El IP₃ y DAG producidos actúan como segundos mensajeros, induciendo la generación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y la activación de la PKC, respectivamente. La activación de PKC conduce a la activación de p38 y ERK MAPK. Syk también es capaz de activar al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav, que activaría a las Rac-GTPasas. La activación de Rac promueve la polimerización de la actina del citoesqueleto y la activación de las vías JNK y NFκB. Por último, Syk también recluta y activa a PI3K, generando esta PtdIns(3,4,5)P₃ en el entorno de la copa fagocítica a partir de la fosforilación de PtdIns(4,5)P₂. Este PtdIns(3,4,5)P₃ también es capaz de activar a las Rac-GTPasas, promoviendo las funciones anteriormente mencionadas asociadas a esta proteína.

3.3. Maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma

Una vez formado el fagosoma, éste sufrirá una serie de cambios que implican la modificación de su composición a nivel de membrana y de su contenido interior, denominándose este proceso maduración del fagosoma⁶⁰ (**Fig. 7**). En él se suceden interacciones proteicas y de fusión con endosomas tempranos, tardíos y finalmente lisosomas, donde se van produciendo diferentes estadios sucesivos de maduración, que tienen como objetivo final la degradación de la partícula fagocitada.

Se encuentran tres tipos de fagosomas en base a su maduración: fagosomas tempranos, tardíos y fagolisosoma, denominados así por el tipo de endosoma fusionado con él^{61,62}.

Fagosoma temprano. Se produce por la fusión del fagosoma con endosomas tempranos⁶³. Este proceso está regulado en primer lugar por la pequeña GTPasa Rab5^{64,65}, la cual recluta a Vps34 (*Vacuolar protein-sorting 34*), una PI3K de clase III que por medio de su actividad acumula fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P) en la membrana del fagosoma⁶⁶. La acumulación de PtdIns3P es fundamental en el proceso de maduración⁶⁷ ya que media en el reclutamiento de EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), proteína que actúa a modo de puente⁶⁸ entre las vesículas por medio de la interacción con Rab5 y promueve el reclutamiento de la pequeña GTPasa Rab7 que participará en el siguiente evento de fusión^{69,70}.

Fagosoma tardío. A medida que madura el fagosoma, se produce una pérdida de Rab5 en la membrana del endosoma que es sustituido por de Rab7⁷⁰. Esta pequeña GTPasa participa en la interfase de transición del fagosoma temprano a fagosoma tardío⁷¹, interviniendo en procesos de anclaje y fusión. Dado que en la membrana de los endosomas tardíos se encuentran las proteínas LAMPs (*Lysosomal-Associated Membrane Proteins*) y en su interior existen proteasas luminales como son catepsinas e hidrolasas, estas proteínas son incorporadas al fagosoma cuando se fusiona con el endosoma tardío^{61,62}. Al mismo tiempo se produce una acumulación del complejo proteico V-ATPasa en la membrana, responsable de acidificar el interior del fagosoma (pH 5.2-5.6) por el bombeo de protones (H⁺) al lumen fagosomal^{72,73}.

Fagolisosoma. Esta vesícula es formada cuando se produce la fusión entre el fagosoma tardío con lisosomas⁶⁰. Este proceso está mediado por diferentes receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Factor, SNAREs*)⁷⁴. En este compartimento se produce la actividad catalítica de las enzimas lisosomales incorporadas y de los complejos moleculares NOX2 e iNOS para llevar a cabo la degradación del microorganismo fagocitado.

Además de la fusión con estos elementos endosomales, el fagosoma puede fusionarse con endosomas procedentes del sistema de reciclaje, elementos multi-vesiculares como el compartimento MHC de clase II e incluso con el retículo endoplasmático^{75,76}, para realizar la presentación de antígenos fagosomales a linfocitos T CD4⁺⁷⁷.

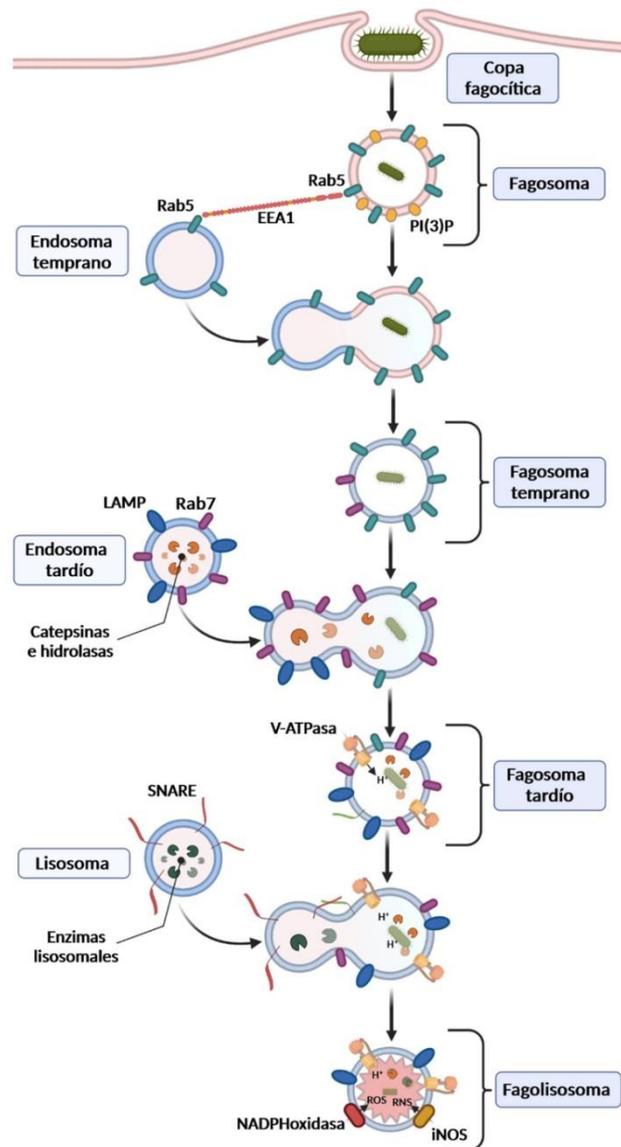


Figura 7. Esquema general del proceso molecular de maduración del fagosoma y formación del fagolisosoma^{25,76,77}. Una vez fagocitado el elemento por medio de la formación de la copa fagocítica, el fagosoma formado sufre una serie de modificaciones moleculares en un proceso denominado maduración del fagosoma. En primer lugar, la acumulación de Rab5 promueve el reclutamiento de Vps34 que se encarga de producir PtdIns3P. El PtdIns3P generado en la membrana del fagosoma promueve la fusión con endosomas tempranos por medio de EEA1. Una vez formado el fagosoma temprano por esta fusión, se recluta Rab7 en la membrana sustituyendo a Rab5. Las moléculas de Rab7 acumuladas promueven la fusión con endosomas tardíos para producir el fagosoma tardío. Esta fusión hace que las catepsinas e hidrolasas del interior del endosoma y las proteínas LAMPs del endosoma, se incorporen al fagosoma tardío formado. A continuación, se produce una acumulación del complejo V-ATPasa que se encarga de introducir H⁺ y acidificar el lumen del fagosoma. Finalmente, por medio de la participación de SNAREs, se produce la formación del fagolisosoma por fusión del fagosoma tardío con lisosomas. En esta etapa se produce la acción catalítica de las enzimas lisosomales incorporadas y la actividad de los complejos moleculares NOX2 e iNOS.

4. Mecanismos microbicidas en macrófagos

La eliminación de los microorganismos fagocitados es llevada a cabo por la participación de diferentes procesos y mecanismos microbicidas, siendo éstos: **1)** acidificación del lumen fagosomal por la acción de V-ATPasas (pH 5.2-5.6)⁷³, **2)** activación de las enzimas hidrolíticas catepsinas, lisozimas y lipasas⁷², y **3)** la acción de los complejos NOX2 e iNOS²⁵, responsables de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y del nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), respectivamente. Dado que estos dos mecanismos son objeto de estudio en esta tesis doctoral, sus características y procesos de activación serán explicados detalladamente en los siguientes puntos.

4.1. Complejo enzimático NOX2 en fagocitos. Subunidades, vías de activación y ensamblaje

La producción de anión superóxido (O_2^-) por células fagocíticas es un paso fundamental en la respuesta inmunitaria innata, ya que éste actúa como precursor de un amplio rango de compuestos químicos denominados ROS (**Fig. 8**), que participan como agentes capaces de eliminar microorganismos bien directamente o por la activación de proteasas⁷⁸⁻⁸¹.

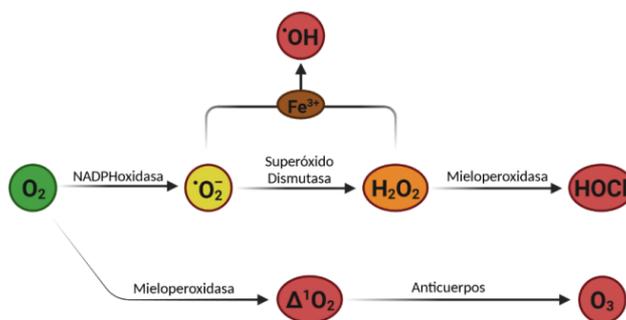


Figura 8. Esquema general de la producción de ROS⁸². El superóxido O_2^- es generado por la acción de la NADPH oxidasa. Dos moléculas de superóxido pueden reaccionar para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante un proceso denominado dismutación que puede ser catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). En presencia de hierro, el O_2^- y el H_2O_2 pueden reaccionar para generar radicales hidroxilos (OH). En zonas de inflamación, se puede producir ácido hipocloroso (HOCl) mediante la enzima fagocítica mieloperoxidasa (MPO) presente en los neutrófilos, a partir de H_2O_2 y cloruros. También la mieloperoxidasa puede catalizar la producción de oxígeno singlete ($\Delta^1\text{O}_2$) desde el O_2 por la oxidación de iones haluros. Por último, el ozono (O_3) puede ser generado a partir del $\Delta^1\text{O}_2$ por moléculas de anticuerpo. El color indica la reactividad de las moléculas (verde, no reactivas; amarillo, limitada; naranja, moderada y rojo, alta).

La reactividad de las ROS producidas, y por tanto sus capacidades microbicidas, difieren en base a sus características químicas. El O_2^- es capaz de reaccionar con los centros de hierro y azufre de las cadenas transportadoras de electrones de bacterias y mitocondrias. El H_2O_2

reacciona con residuos de cisteína localizados en los sitios activos de algunas enzimas inactivándolas. Por medio de la acción de peroxidasa sobre el H_2O_2 se produce HOCl, el cual es capaz de difundir y producir la cloración de tirosinas y la modificación oxidativa de enzimas, que producen su inactivación. Los $\cdot\text{OH}$, además del $\Delta^1\text{O}_2$ y O_3 , presentan gran potencial de reacción frente a diversas biomoléculas y son capaces de producir importantes daños oxidativos⁸².

La producción de $\cdot\text{O}_2^-$ en células fagocíticas está mediada por el complejo multiproteico enzimático NADPH oxidasa, denominado también como NOX2. Éste se encuentra inactivado en células en estado de reposo, pero es activado después de que el fagocito interactúe con el agente patógeno y se produzca su internalización mediada por el fagosoma^{78,80,83}. También puede activarse por medio de mediadores inflamatorios⁸².

La NOX2 de fagocitos está constituida por diferentes subunidades proteicas, las cuales se clasifican en dos tipos en función de su localización: subunidades de membrana y subunidades citosólicas. Las subunidades de membrana están constituidas por el flavocitocromo b_{588} (cyt b_{558}) que es un heterodímero formado por $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y p22^{phox} . Las subunidades citosólicas están constituidas por las proteínas multidominio p67^{phox} , p47^{phox} y p40^{phox} así como las Rac-GTPasas⁸⁴.

Para generar una NOX2 activa es necesario el ensamblaje de las subunidades citosólicas a las subunidades de membrana. Este proceso es el resultado de una serie de eventos muy regulados molecularmente, tanto a nivel espacial como temporal en el fagosoma, para así evitar daños ocasionados por ROS en las células y tejido del hospedador⁸⁰.

4.1.1. Subunidades de membrana. Estructura y características generales

Las subunidades $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y p22^{phox} son proteínas integrales de membrana que constituyen el núcleo catalítico de la NOX2 una vez activada. La asociación entre ellas es fundamental para la maduración y estabilidad del flavocitocromo b_{588} ⁸⁵.

La **subunidad $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (Fig. 9)**, denominada también NOX2 o subunidad β del citocromo, presenta un peso molecular de 65.3 kDa aunque debido a que se puede encontrar altamente glicosilada, puede llegar hasta los 100 kDa^{78,86}. El extremo C-terminal expuesto al citoplasma, contiene sitios de unión para el flavín adenín dinucleótido (FAD) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En la región transmembrana se encuentran anclados dos grupos hemo por medio de dos pares de histidinas⁸⁷. Esta subunidad es la responsable de la reacción de transferencia de electrones, la cual se realiza en dos pasos. En primer lugar los electrones

son transferidos desde el NADPH al FAD y luego por medio de los grupos hemo se reduce el O_2 a $\cdot O_2^-$, en una reacción de transferencia de electrones⁸⁸⁻⁹¹.

La **subunidad p22^{phox}** (**Fig. 9**), subunidad α del citocromo, presenta un peso molecular de 21 kDa. El extremo C-terminal expuesto al citoplasma, contiene un motivo PRR (*Proline-Rich Region*) formado por la secuencia consenso PxxP (Pro-Xaa-Xaa-Pro) alrededor de la Prolina en posición 156. Este motivo PRR actúa como sitio de unión a la subunidad citosólica p47^{phox} a través del dominio SH3_B, durante el proceso de ensamblaje de la NOX2^{92,93}.

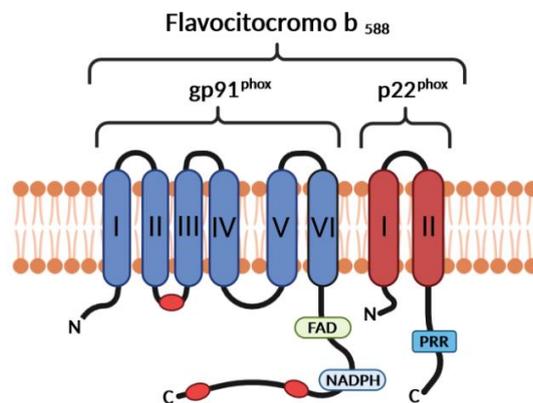


Figura 9. Esquema de la organización estructural del flavocitocromo b₅₈₈⁸⁴. El flavocitocromo b₅₈₈ se encuentra constituido por la subunidad gp91^{phox} y p22^{phox}. La subunidad gp91^{phox} es una proteína constituida por 570 aminoácidos y está organizada en 6 α -hélices, presenta en el dominio C-terminal los sitios de unión para el FAD y el NADPH. En rojo, se muestran las regiones de interacción con la subunidad citosólica p47^{phox} en estado activado. La subunidad p22^{phox} es una proteína constituida por 195 aminoácidos y se organiza en 2 α -hélices, localizándose en el dominio C-terminal el motivo PRR de unión con p47^{phox} en estado activado.

4.1.2. Subunidades citosólicas. Estructura y características generales

La **subunidad p47^{phox}** (**Fig. 10**), presenta un peso molecular de 44.7 KDa. El extremo N-terminal contiene un dominio PX (*Phox homology*), la región central tiene dos dominios SH3 (SH3_A y SH3_B) y el extremo C-terminal está constituido por: una región básica rica en residuos de arginina y lisina (región polibásica) que contiene una región de autoinhibición (*AIR, Auto-Inhibitory Region*) y un motivo PRR^{84,94}.

El dominio PX situado en el extremo N-terminal, muestra capacidad de reconocimiento y unión al fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PtdIns(3,4)P₂) y al ácido fosfatídico.^{95,96} La región de autoinhibición en condiciones de reposo se encuentra interactuando mediante puentes de hidrógeno con el dominio SH3_B. Esto evita la interacción con la subunidad de membrana p22^{phox} a través de su motivo PRR y su movilización a membrana^{78,83,97}.

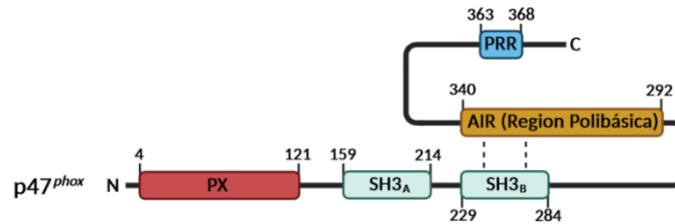


Figura 10. Esquema de la organización estructural de la subunidad citosólica p47^{phox} en condiciones de reposo⁸⁴. La subunidad p47^{phox} es una proteína constituida por 390 aminoácidos, presenta un dominio PX, comprendido entre los aminoácidos (AA 4-121), un primer dominio SH3_A (AA 159-214) y un segundo dominio SH3_B (AA 229-284) que interacciona en condiciones de reposo con AIR (AA 292-340). En el extremo C-terminal está situado el motivo PRR (AA 363-368).

La **subunidad p67^{phox}** (**Fig. 11**), presenta un peso molecular de 67 kDa. El extremo N-terminal está constituido por cuatro dominios que contienen motivos TPR (*Tetratricopeptide Repeat*; TPR1-TPR4), siendo responsable de la interacción con Rac-GTPasas⁹⁸⁻¹⁰⁰ y de promover el ensamblaje de la NOX2¹⁰¹. La región central está constituida por un dominio de activación (AD, *Activation Domain*) fundamental para la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ ¹⁰² y, un motivo PRR y dominio SH3 (SH3_A) encargados también de participar en la regulación de la actividad y del ensamblaje. El extremo C-terminal presenta un dominio PB1 (*Phox* y *Bem1*), capaz de interactuar con p40^{phox} a través de su dominio PB1^{103,104}, y un segundo dominio SH3 (SH3_B) que interacciona con el motivo PRR de p47^{phox}^{84,105}.

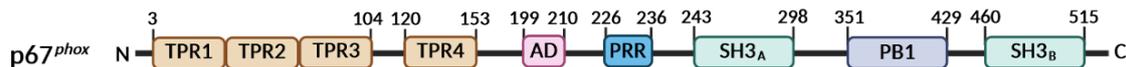


Figura 11. Esquema de la organización estructural de la subunidad citosólica p67^{phox} en condiciones de reposo⁸⁴. La subunidad p67^{phox} es una proteína constituida por 526 aminoácidos, presenta cuatro motivos TPR situados, 3 de ellos situados de manera consecutiva, TPR1-TPR2-TPR3 (AA 3-104) y otro separado TPR4 (AA 120-153). En la región central se localiza el dominio AD (AA 199-210), el motivo PRR (AA 226-236) y un primer dominio SH3_A (AA 243-298). En el extremo C-terminal, se encuentra PB1 (AA 351-429) y el segundo dominio SH3_B (AA 460-515).

La **subunidad p40^{phox}** (**Fig. 12**), presenta un peso molecular de 39 kDa. El extremo N-terminal contiene un dominio PX, que muestra capacidad de unión específica al PtdIns(3,4,5)P₃ acumulado en la membrana del fagosoma, promoviendo así al ensamblaje de la NOX2^{95,96}. La región central presenta un dominio SH3 que interacciona con el p47^{phox} a través de su motivo PRR. Por último en el extremo C-terminal, se encuentra un dominio PB1, capaz de interactuar con p67^{phox} por medio de su otro dominio PB1^{106,107}.

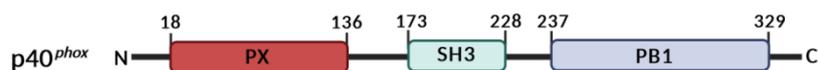


Figura 12. Esquema de la organización estructural de la subunidad citosólica p40^{phox} en condiciones de reposo⁸⁴. La subunidad p40^{phox} es una proteína constituida por 339 aminoácidos, presenta un dominio PX (AA 18-136), un dominio SH3 (AA 173-228) y un dominio PB1 (AA 237-329), situado en el extremo C-terminal.

En condiciones de reposo, las subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} se encuentran asociadas en el citosol en una estructura denominada triada (**Fig. 13**). Esta estructura es el resultado de la interacción entre sitios específicos de las tres subunidades citosólicas⁸⁷.

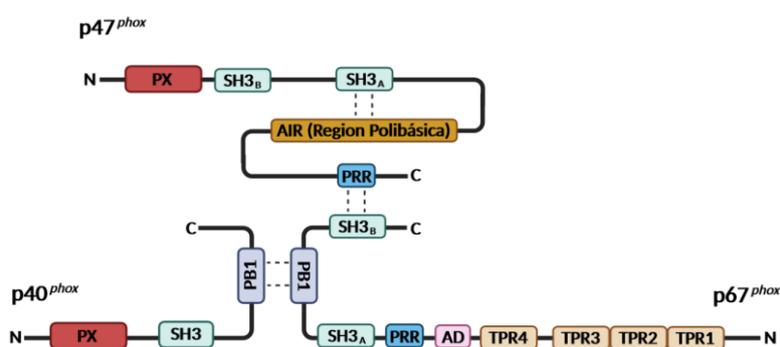


Figura 13. Esquema de la interacción en triada de las subunidades p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} en estado de reposo⁸⁷. La estructura en triada es resultante de la interacción entre los dominios PB1 de p40^{phox} y p67^{phox}, y del dominio SH3_B de p67^{phox} y el motivo PRR de p40^{phox}.

Las **Rac-GTPasas** son proteínas que pertenecen a la familia de las pequeñas Rho GTPasas. Por sus características actúan como interruptores moleculares regulando una amplia variedad de procesos celulares¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Dentro de las Rac-GTPasas se encuentran las isoformas Rac1, Rac2 y Rac3. Rac2 se presenta principalmente en neutrófilos humanos, mientras que en neutrófilos de ratón se encuentran Rac1 y Rac2 en las mismas proporciones¹¹¹, siendo la isoforma Rac2 crítica para la activación de NOX2¹¹²⁻¹¹⁵.

Las proteínas Rac1 y Rac2, presentan tres dominios funcionales altamente conservados que incluyen las regiones *switch I*, *switch II* y de inserción. En el extremo C-terminal presentan una región geranilgeranilada, que es la responsable de la unión con la membrana¹¹⁶.

Además, de ser crucial para la formación de la NOX2 activa, las Rac-GTPasas también son capaces de: activar la vía de la p38 MAPK a través de la proteína efectora PAK (*p21-Activated Kinase*)¹¹⁷, modular la polimerización de actina^{118,119}, fagocitosis¹²⁰, procesos relacionados con la quimiotaxis, movilidad celular y la transcripción de genes¹²¹.

4.1.3. Vías de activación y ensamblaje de NOX2

Para la correcta activación de NOX2 son necesarios el desarrollo de varios eventos fundamentales: **1)** fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana, **2)** activación de Rac-GTPasas y **3)** movilización de subunidades citosólicas a la membrana y ensamblaje de NOX2⁸⁷.

A continuación, se explicarán las vías de activación y proteínas implicadas en cada uno de estos eventos y la manera en la que se realiza el ensamblaje de NOX2.

4.1.3.1. Fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana

La fosforilación de las subunidades de NOX2 es un proceso clave en el ensamblaje y su activación. Todas las subunidades son susceptibles de ser fosforiladas a excepción de Rac-GTPasa. La fosforilación es un proceso ejecutado por diferentes proteínas con capacidad quinasa⁸⁷ entre las que se encuentran principalmente implicadas la PKC¹²²⁻¹²⁸, p38 y ERK1/2 MAPK^{125,129,130}. Además de éstas, también pueden participar en los eventos de fosforilación AKT e IRAK-4 (*IL-1 Receptor-Associated Kinase-4*), las cuales llevarían a cabo su actividad quinasa cuando son activadas vía PI3K¹³¹⁻¹³³.

La **PKC** constituye un conjunto de isoenzimas que pertenecen a una familia de quinasas de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) y que a su vez forman parte de la superfamilia de la proteína quinasas AGC (*cAMP-dependent, cGMP-dependent, and protein kinase C*)¹³⁴. Las isoenzimas de PKC se dividen en tres subfamilias en base a su estructura y requerimientos de cofactores y calcio para su actividad. La primera de ellas es la subfamilia de las PKCs clásicas (PKC α , PKC β I y PKC β II) que son activadas por DAG y calcio. La segunda agrupa a las PKCs nuevas (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ y PKC η) que son activadas por DAG solamente. Por último, está la subfamilia de las PKCs atípicas (PKC ζ y PKC ι/λ) que no requieren de DAG ni de calcio para su actividad¹³⁴.

Las subfamilias de la PKC que intervienen principalmente en la activación de NOX2 pertenecen a las clásicas y nuevas, teniendo en común que para su activación requieren todas ellas de DAG, que actúa como un activador alostérico (**Fig. 14**). Este DAG es producido vía PLC γ , por medio de su acción catalítica sobre el PtdIns(4,5) P_2 en la que además, se libera una molécula de IP $_3$. EL DAG producido activaría directamente la PKC, mientras que el IP $_3$ provocaría la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático al citosol, activando las PKC clásicas¹³⁵.

Es importante indicar que otra vía de generación de DAG es por medio de la fosfolipasa D (PLD) (Fig. 14). Esta ejerce su actividad catalítica sobre la fosfatidilcolina, produciendo colina y ácido fosfatídico, el cual puede ser convertido en DAG por medio de una ácido fosfohidrolasa o interactuar con el dominio PX de la subunidad p47^{phox} 136.

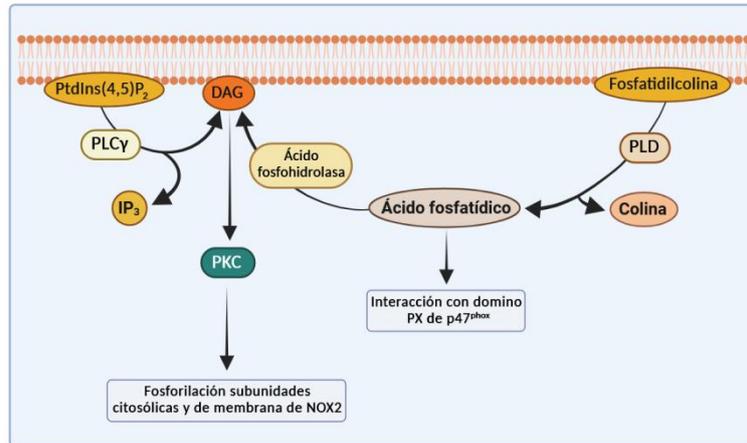


Figura 14. Esquema de las vías de generación de DAG y activación de la PKC¹³⁶. EL DAG puede ser producido por varias vías. Una de ellas sería por medio de la acción de la PLCγ que, a través de su acción catalítica sobre el PtdIns(4,5)P₂ generaría además una molécula de IP₃. Otra vía de producción es a través de la PLD. En primer lugar, por la acción catalítica de la PLD sobre la fosfatidilcolina, se genera colina y ácido fosfatídico. Posteriormente por la acción de una ácido fosfohidrolasa, el ácido fosfatídico se convertiría en DAG. El ácido fosfatídico producido por la actividad PLD, también puede participar en interacciones con el dominio PX de la subunidad citosólica p47^{phox} para anclarla a la membrana. Independientemente del origen del DAG, éste sería capaz de activar a la PKC para promover la fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana de NOX2.

La **p38 MAPK** constituye un conjunto de isoenzimas con actividad quinasa sobre residuos de Ser y Thr, pertenecientes a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos¹³⁷. Existen cuatro isoenzimas de p38, denominadas p38α, p38β, p38γ y p38δ, presentando un peso molecular de 38 kDa¹³⁸.

ERK1/2 MAPK son proteínas con actividad quinasa sobre residuos de Ser y Thr pertenecientes también a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos¹³⁹. La isoforma ERK1 presenta un peso molecular de 44 kDa, mientras que ERK2 tiene un peso molecular de 42 kDa¹⁴⁰.

A continuación, se indicarán los eventos de fosforilación ocurridos en las diferentes subunidades de NOX2 para su activación.

Subunidad p47^{phox}

La fosforilación de la subunidad p47^{phox} (Fig. 15) tiene lugar en 11 residuos de Ser⁸⁴. Las proteínas con capacidad quinasa capaces de fosforilar estos residuos son: PKC (isoformas α , β , δ y ζ)¹⁴¹⁻¹⁴³, p38 y ERK1/2 MAPK^{144,145}, PAK¹⁴⁶, Casein kinase 2¹⁴⁷ y AKT¹⁴⁸.

En primer lugar, se produce la fosforilación de 6 residuos situados en la región de autoinhibición por medio de la PKC (isoformas α , β , δ y ζ)¹⁴¹⁻¹⁴³. A nivel experimental se ha comprobado que la fosforilación de los residuos **Ser 303, 304 y 328 situados en esta región** son fundamentales para la activación de NOX2. Este evento provoca la pérdida de interacción entre la región de autoinhibición y el segundo dominio SH3 (SH3_B), haciendo que éste quede libre y pueda interactuar con el motivo PRR de p22^{phox}, produciendo así la movilización de la subunidad citosólica p47^{phox} a la membrana⁸⁴.

Los residuos **Ser 345 y 348**, situados fuera de la región polibásica, presentan la secuencia consenso de fosforilación por MAPK y son fosforilados durante el proceso de activación de NOX2¹⁴⁹. Se ha visto a nivel experimental que el residuo **Ser 345** puede ser fosforilado por p38 MAPK a través del TNF α y por ERK1/2 MAPK por medio del factor estimulante de colinas de granulocitos y monocitos (GM-CSF, *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*)¹²⁹. Una vez fosforilado el residuo **Ser 345**, actúa como sitio de unión a prolinas isomerasas (Pin1)¹⁵⁰ que por medio de su actividad catalítica, provoca un cambio conformacional en p47^{phox} que permite que los residuos **Ser 359, 370 y 379** queden expuestos a la actividad quinasa de la PKC¹⁵¹. Al ser fosforilados éstos últimos, interactúan con el dominio SH3_B de p67^{phox}, lo que iría promoviendo el ensamblaje de NOX2.

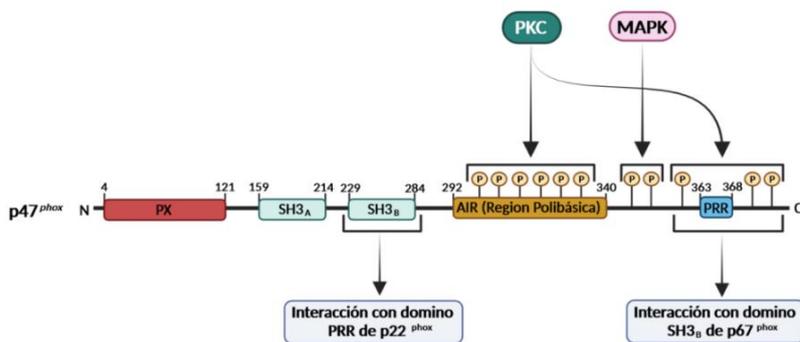


Figura 15. Esquema de los eventos de fosforilación y cambios conformacionales asociados durante la activación de la subunidad citosólica p47^{phox}. La subunidad p47^{phox} es fosforilada en primer lugar en la región AIR por acción de la PKC, en los residuos Ser 303, 304, 310, 315, 320 y 328. Esta fosforilación provoca una pérdida de interacción de esta región con el dominio SH3_B, quedando éste libre para interactuar con el motivo PRR de p22^{phox}. Por medio de la acción de MAPK se fosforilan residuos Ser 345 y 348, que inducen cambios conformacionales para que los residuos Ser 359, 370 y 379, situados cerca del motivo PRR, puedan ser fosforilados por la PKC. La fosforilación de estos residuos permite la interacción del motivo PRR de p47^{phox} con el dominio SH3_B de p67^{phox}.

Subunidad p67^{phox}

La subunidad p67^{phox} presenta residuos de Ser y Thr que pueden ser fosforilados (**Fig. 16**). De todos ellos el residuo **Thr 233** situado en el motivo PRR, es el que se piensa que tiene un mayor efecto funcional sobre la activación de NOX2⁸⁷. Se ha comprobado a nivel experimental que su fosforilación se puede inducir por medio de estimulación con TNF α o PAF (*Platelet-Activating Factor*) en neutrófilos humanos y que se puede realizar por p38¹⁵², ERK1/2 MAPK, PKC y PAK¹⁵²⁻¹⁵⁵. El resto de residuos fosforilables existentes en el extremo N-terminal y C-terminal de p67^{phox} pueden ser fosforilados también, pero se desconoce su implicación en el proceso de activación de NOX2⁸⁴.

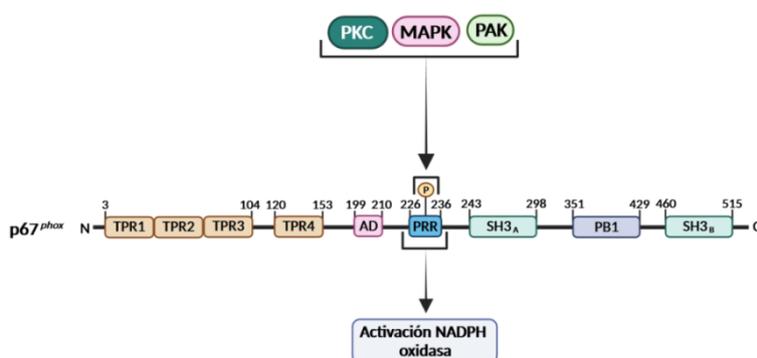


Figura 16. Esquema de los eventos de fosforilación y cambios conformacionales asociados durante la activación de la subunidad citosólica p67^{phox}. La subunidad p67^{phox} puede ser fosforilada en el residuo Thr 233 situado en el motivo PRR, por medio de la PKC, p38, ERK MAPK y PAK. Esta fosforilación genera un cambio conformacional que facilita la interacción entre el dominio SH3_B de p67^{phox} y el motivo PRR de p47^{phox}, promoviendo la activación de NOX2.

Subunidad p40^{phox}

La subunidad p40^{phox} presenta los residuos **Thr 154** y **Ser 315** que pueden ser fosforilados por la actividad quinasa de la PKC (**Fig. 17**). El residuo **Thr 154**, se encuentra próximo al dominio SH3, mientras que el residuo **Ser 315**, se encuentra en el extremo C-terminal del dominio PB1¹²². La fosforilación de estos residuos se ha comprobado a nivel experimental empleando PMA (*Phorbol 12-Myristate 12-Acetate*) y fMLF (*N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*) en neutrófilos humanos¹²². Además, se ha observado que la fosforilación de estos residuos aumenta la interacción de p67^{phox} con la subunidad de membrana gp91^{phox}¹⁵⁶ y que la fosforilación del residuo **Thr 154** promueve el reclutamiento de p47^{phox} al fagolisosoma. Por lo que la fosforilación de estos residuos en p40^{phox} serían esenciales para el correcto ensamblaje de NOX2 y su activación en el fagosoma⁸⁷.

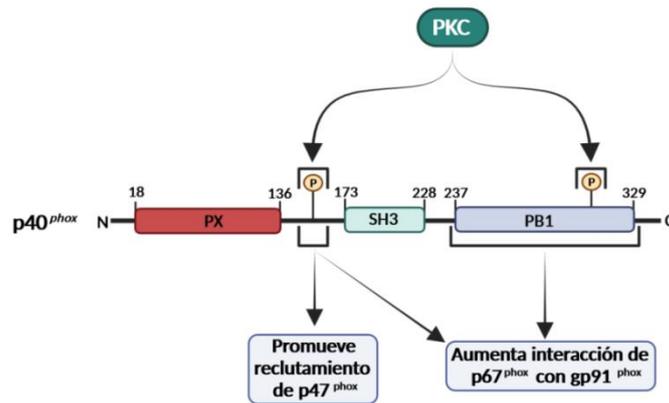


Figura 17. Esquema de los eventos de fosforilación y cambios conformacionales asociados durante la activación de la subunidad citosólica p40^{phox}. La subunidad p40^{phox} es fosforilada por la acción de la PKC en los residuos Thr 154 y Ser 315. El residuo Thr 154 fosforilado promueve el reclutamiento de p47^{phox}. Este residuo junto con el residuo Ser 315 fosforilado localizado en el dominio PB1, producen un aumento de interacción de p67^{phox} con gp91^{phox}.

Subunidad gp91^{phox}

Las subunidades de membrana también pueden ser fosforiladas (**Fig. 18**). La subunidad gp91^{phox} presenta residuos situados en la región C-terminal que pueden ser fosforilados. La fosforilación de estos residuos se realiza por medio de la acción de la PKC, promoviendo la unión de las subunidades Rac2, p67^{phox} y p47^{phox}, y la transferencia de electrones para reducir el O₂ a •O₂⁻ en el sitio catalítico¹⁵⁷.

Subunidad p22^{phox}

La subunidad p22^{phox} es fosforilada en los residuos **Thr 132 y 147 (Fig. 18)**. De ellos, el residuo **Thr 147** es el principal sitio de fosforilación, produciéndose ésta por la acción de la PKC o por medio de la PLD a través de proteínas quinasas activadas por ácido fosfatídico⁸⁷. Dado que estos residuos se encuentran muy próximos a la región PRR, que es la que interactúa con la subunidad p47^{phox}, su fosforilación permite la interacción y unión con esta subunidad de membrana durante el proceso de ensamblaje de NOX2⁸⁴.

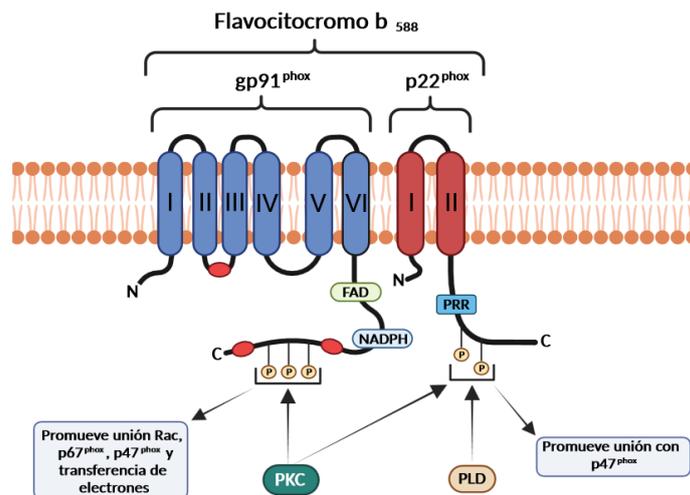


Figura 18. Esquema de los eventos de fosforilación y cambios conformacionales asociados durante la activación del flavocitocromo b₅₈₈. La subunidad gp91^{phox} es fosforilada por la acción de la PKC en residuos situados en la región C-terminal. Esta fosforilación promueve la unión a Rac-GTPasas activadas, p67^{phox} y p47^{phox}, y también son importantes en la producción de *O₂. La subunidad p22^{phox} se fosforila en los residuos Thr 132 y 147, por acción de la PKC y por la acción de proteínas quinasas activadas por ácido fosfatídico producido por la acción de la PLD. Estos residuos fosforilados promueven la unión con p47^{phox}.

4.1.3.2. Activación de Rac-GTPasas

Un paso crucial para el ensamblaje de NOX2 es la activación de Rac-GTPasas y su interacción con la subunidad citosólica p67^{phox}. Esta interacción ocurre después de que Rac se active y se movilice a la membrana, sin previa asociación con p67^{phox} ⁸⁴ (Fig. 19).

La actividad de las Rac-GTPasas está mediada por el tipo de nucleótido de guanina al que está unido. La forma inactiva de Rac se encuentra unida a GDP y situada en el citosol. El estado de reposo es inducido por las proteínas GAP (*GTPase-Activating Proteins*), que son las responsables de la generación de GDP a partir de la hidrólisis del GTP que estaba asociado a la forma activa de Rac¹⁵⁸. Además, en estado de reposo Rac se encuentra asociada en su región geranilgeranilada con el factor RhoGDI (*Rho GDP-Dissociation Inhibitor*). Este factor evita la interacción y consecuente unión a membrana, haciendo por tanto que en estado de reposo, Rac1 y Rac2 se encuentren en el citosol^{159,160}.

Cuando se produce el estímulo de activación, se provoca el intercambio de GDP por GTP mediado por GEF (*Guanine-nucleotide-Exchange Factors*)¹⁶¹, RhoGDI se disocia y permite la movilización a la membrana independientemente de las otras subunidades de NOX2¹⁶². La activación de las Rac-GTPasas puede estar iniciado por receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G-Protein-Coupled Receptor*), factores de crecimiento como PDGF, EGF, insulina¹⁶³, fMLP^{164,165}, señalización a través del TLR2¹⁶⁶ y TLR4¹⁶⁷, y fagocitosis mediada por FcR^{55,168,169}.

Cuando participa en la activación de NOX2, se ha visto que su activación es dependiente de la p38 MAPK a través de la vía PI3K¹³⁷.

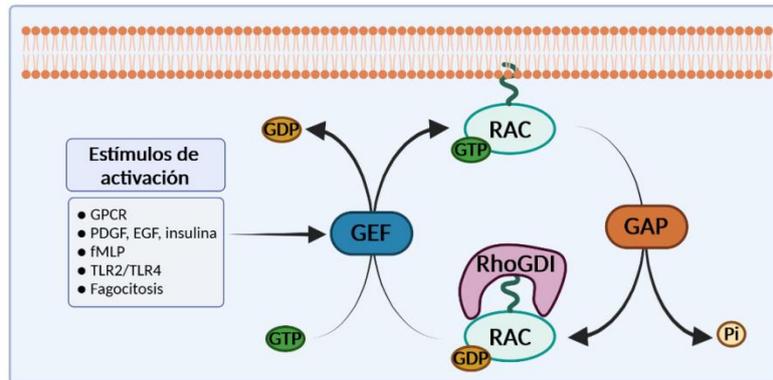


Figura 19. Esquema de la activación e inactivación de las Rac-GTPasas. La activación de las Rac-GTPasas está promovida por diferentes estímulos, los cuales provocan que GEF se active, intercambie GDP por GTP y que RhoGDI se disocie de Rac. Esto provoca que Rac se movilice a membrana, generando así el estado activo de las Rac-GTPasas. La inactivación de Rac se produce por la acción de GAP, la cual se encarga de hidrolizar el GTP asociado a la forma activa, quedando GDP en Rac y generando una molécula de Pi. El GDP presente en Rac, permite la interacción con RhoGDI, generando de esta forma el estado inactivo de las Rac-GTPasas.

La interacción entre la subunidad citosólica p67^{phox} y Rac se lleva a cabo entre el dominio TPR3 de p67^{phox} con la región *switch 1* y la región C-terminal de Rac¹¹⁶. Existen varias teorías que explican el papel de la interacción de p67^{phox} y las Rac-GTPasas en la producción de ROS. Una de ellas se basa en que las Rac-GTPasas actuarían como una proteína estructural que garantizaría una posición correcta de p67^{phox} en el flavocitocromo b₅₈₈^{170,171}, la otra se basa en que las Rac-GTPasas tendrían un papel activo y directo en la transferencia de electrones¹⁷².

4.1.3.3. Movilización de subunidades citosólicas a la membrana y ensamblaje de NOX2

Para la activación completa de NOX2 se requiere de una correcta movilización y ensamblado de las subunidades citosólicas a las de membrana. Esto se lleva a cabo mediante interacciones proteína-proteína y proteína-lípido.

En los puntos anteriores se ha explicado como las fosforilaciones en las subunidades citosólicas y de membrana, así como la interacción entre Rac-GTPasa y p67^{phox}, promueven a interacciones de tipo proteína-proteína y al ensamblado de NOX2. El otro tipo de interacciones, las del tipo proteína-lípido, están promovidas por la acción de PI3K (Fig. 20) y la PLD.

La **PI3K** pertenece a una gran familia de enzimas que se clasifican en base a su estructura y funciones en tres clases: PI3K de clase I, clase II y clase III¹⁷³. Las **PI3K de clase I** fosforilan PtdIns(4,5)P₂ para producir PtdIns(3,4,5)P₃ y su activación se puede desencadenar por diferentes receptores de membrana asociados a proteínas G y a tirosina quinasas. El PtdIns(3,4,5)P₃ producido puede ser defosforilado bien en la posición carbono 3 por la 3-fosfatasa PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) para producir de nuevo PtdIns(4,5)P₂ o bien, en la posición carbono 5 por la 5-fosfatasa SHIP (*SH2-containing Inositol Phosphatase*) para producir PtdIns(3,4)P₂, un lípido con un papel fundamental en vías de activación, formación del fagosoma, así como en el ensamblaje de NOX2^{66,69,174}. Las **PI3K de clase III**, fosforilan PtdIns en el entorno lisosoma-endosoma para formar PtdIns3P y su activación está promovida por procesos de opsonización, fagocitosis de bacterias y levaduras. El PtdIns3P producido tiene una función clave en el tráfico de vesículas, maduración del fagosoma y en la activación y ensamblaje de NOX2^{66,175}. Las **PI3K de clase II**, están menos estudiadas en el contexto de células fagocíticas, pero probablemente participen en la producción de PtdIns3P después de la activación de receptores de membrana¹⁷⁴.

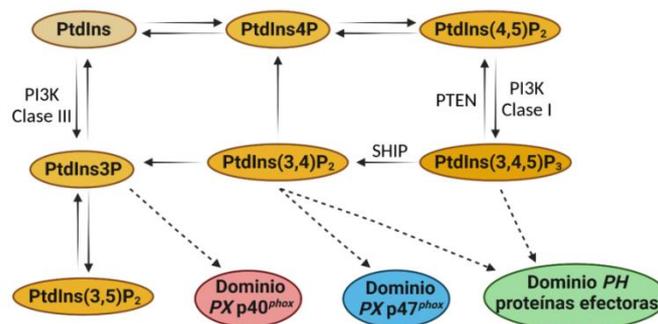


Figura 20. Esquema de la producción de fosfatidilinositoles por acción de la PI3K e interacciones asociadas¹⁷⁴. La PI3K de clase I es capaz de producir PtdIns(3,4,5)P₃ a partir de PtdIns(4,5)P₂. Éste puede ser defosforilado por PTEN para producir de nuevo PtdIns(4,5)P₂ o por SHIP para producir el isómero PtdIns(3,4)P₂. La PI3K de clase III produce PtdIns3P a partir de PtdIns. Los fosfatidilinositoles producidos interaccionan con dominios conservados localizados en las proteínas sobre las que actúan. Éstos son, los dominios PH (*Pleckstrin Homology*) que interaccionarían con PtdIns(3,4,5)P₃ y PtdIns(3,4)P₂, los dominios PX que interaccionarían con PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns3P, y los dominios FYVE que interaccionarían solamente con PtdIns3P.

Durante la movilización de las subunidades citosólicas y ensamblaje de NOX2, las interacciones proteína-lípido que tienen lugar ocurren entre el dominio PX de p47^{phox} y PtdIns(3,4)P₂, y el dominio PX de p40^{phox} con PtdIns3P¹⁷⁶. Además de la interacción del dominio PX de p47^{phox} con el PtdIns(3,4)P₂, tiene lugar una interacción sinérgica con ácido fosfátidico producido vía PLD. Por lo tanto, la PLD es otra proteína fundamental que interviene en estos procesos¹⁷⁷.

La **PLD** es una enzima que, por medio de su actividad catalítica sobre la fosfatidilcolina, genera colina y ácido fosfatídico. Su activación se puede producir por medio de fMLP¹³⁶, por procesos de opsonización^{178,179} e infección con microorganismos¹⁸⁰. Además de esta función del ácido fosfatídico sobre p47^{phox}, éste puede convertirse en DAG por medio de una ácido fosfatídico fosfohidrolasa, siendo esta una vía de activación de la PKC independiente de PLC¹³⁶.

El proceso de movilización y ensamblaje de las subunidades citosólicas a las de membrana, está mediado por la interacción entre subunidades, promovidas por cambios conformacionales producidos por la fosforilación de determinados residuos. En la siguiente figura (**Fig. 21**), se muestra un resumen con los eventos clave para la activación y ensamblaje de NOX2.

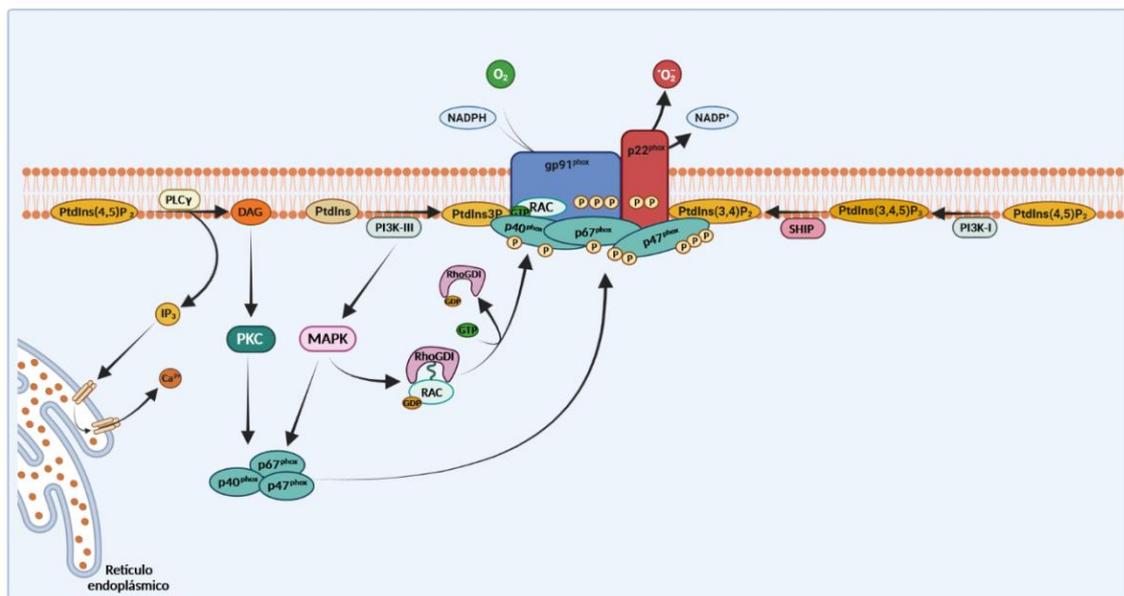


Figura 21. Esquema general del proceso de activación y ensamblaje de NOX2. En el proceso de activación y ensamblaje de NOX2, se requieren de varios eventos fundamentales: **1)** fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana, **2)** activación de Rac-GTPasa y **3)** movilización de las subunidades citosólicas a la membrana. La fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana de NOX2, está llevada a cabo por diferentes proteínas con actividad quinasa. Entre ellas se encuentran la PKC, la cual es activada por medio del DAG producido por la acción de la PLC γ sobre el PtdIns(4,5)P₂. En relación con las subunidades citosólicas, la PKC provoca la fosforilación de la subunidad p47^{phox}, permitiendo la interacción con la subunidad de membrana p22^{phox}. Además de la PKC, la p38 MAPK es capaz de fosforilar la subunidad p47^{phox}. Esto provoca un cambio conformacional que permite de nuevo la acción quinasa de la PKC y la posterior interacción con la subunidad p67^{phox}. La PKC, también fosforila la subunidad p40^{phox}. Las fosforilaciones en ella promueven el reclutamiento de p47^{phox} y aumenta la interacción de p67^{phox} con la subunidad gp91^{phox}. Por último, tanto la PKC, como MAPK y PAK, presentan actividad quinasa sobre la subunidad citosólica p67^{phox}, estando relacionada esta fosforilación con la activación de NOX2. Atendiendo a las subunidades de membrana, la PKC es capaz de fosforilar las subunidades gp91^{phox} y p22^{phox}, permitiendo esto el ensamblaje de las subunidades citosólicas fosforiladas. La activación de NOX2, requiere de la movilización de la forma activa de Rac-GTPasas a la membrana y su asociación con p67^{phox}. La activación de esta proteína está mediada por la acción de p38 MAPK a través de la vía PI3K, la cual provoca la liberación de la proteína inhibidora RhoGDI y el intercambio de GDP por GTP en las Rac-GTPasas. Finalmente, para una correcta activación y ensamblado de NOX2 se requiere de interacciones proteína-lípido. Esta interacción está promovida por la actividad de la PI3K principalmente. Por medio de su actividad quinasa, la PI3K de clase III, produce PtdIns3P a partir de PtdIns, el cual sirve de anclaje de p40^{phox}. También la PI3K de clase I por medio de su acción sobre PtdIns(4,5)P₂, produce PtdIns(3,4,5)P₃, el cual es defosforilado por SHIP para producir PtdIns(3,4)P₂, que sirve de anclaje para la subunidad p47^{phox}.

4.2. Óxido nítrico sintasa inducible

La producción de óxido nítrico (NO) tiene un papel fundamental como mecanismo microbicida en $M\phi$ ^{181,182}. Además, es capaz de participar en la regulación de la diferenciación y función de células inmunitarias por medio de la nitración de moléculas clave implicadas en vías de señalización y transcripción¹⁸³. También puede actuar como una importante molécula de señalización celular, capaz de mediar en procesos fisiológicos tales como vasodilatación, relajación muscular y neurotransmisión¹⁸⁴.

El NO es producido por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS, *Nitric Oxide Synthases*), por medio de la oxidación de L-arginina a L-citrulina. Existen tres isoformas de NOS, dos de ellas se encuentran constitutivamente expresadas en neuronas (nNOS) y en endotelio (eNOS), y la tercera que es inducida por medio de diferentes estímulos, es denominada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)¹⁸⁴.

Por sus características químicas, el NO es capaz de difundir fácilmente y presenta una variedad de efectos microbicidas, que irían desde romper o inactivar enzimas por su alta afinidad al hierro de grupos hemo¹⁸⁵, nitrosilar cisteínas¹⁸⁶ y combinarse para formar RNS como trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y anión peroxinitrito ($ONOO^-$)¹⁸⁷ (**Fig. 22**). El $ONOO^-$ es un potente agente oxidante y nitrante, y junto con el NO puede causar daño en el ADN por procesos de desaminación oxidativa¹⁸⁸.

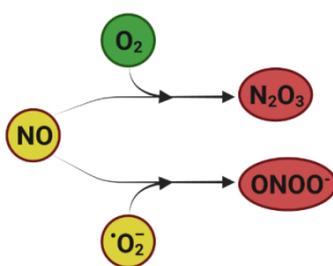


Figura 22. Esquema general de la producción de RNS¹⁸⁷. El NO producido por la acción de NOS, puede ser combinado con O_2 para generar N_2O_3 . También el NO puede combinarse con $^{\bullet}O_2^-$ producido por NOX2, para formar $ONOO^-$. El color indica la reactividad de las moléculas (verde, no reactivas; amarillo, limitada y rojo, alta).

4.2.1. Expresión de iNOS

La expresión de iNOS está regulada principalmente a nivel transcripcional^{189,190} (**Fig. 23**). El mecanismo celular de expresión comienza cuando el estímulo adecuado se une a su correspondiente receptor situado en la superficie celular. Los estímulos que inducen la

expresión de iNOS son citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e $\text{IFN}\gamma$, componentes de patógenos como el LPS^{234,238}, u otros presentes en las paredes celulares de bacterias e incluso hongos¹⁸⁷. Después de la unión del estímulo a su receptor, se provoca una cascada de señalización mediada por quinasas que se encargan de fosforilar y activar a factores de transcripción específicos, entre los que se encuentran NF- κ B y STAT-1a¹⁸⁹. Una vez activados estos factores de transcripción, se translocan al núcleo donde por medio de su acción, inducen la expresión de la enzima.

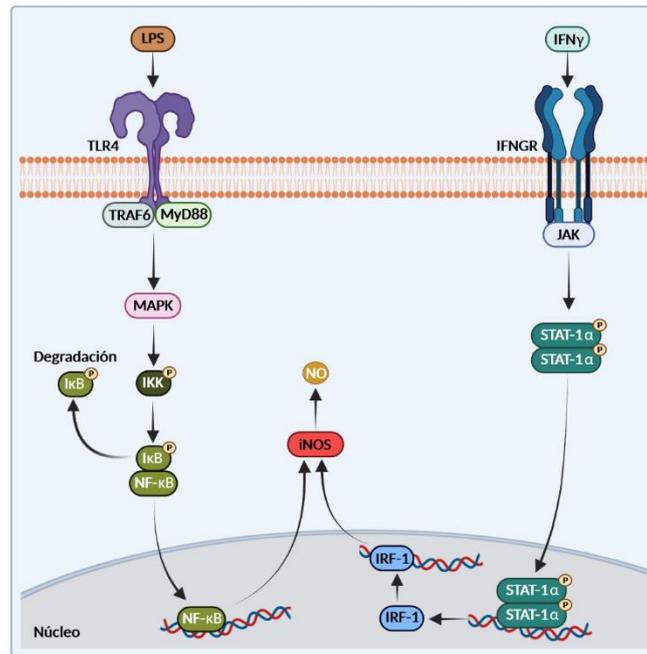


Figura 23. Esquema general de la regulación transcripcional en la expresión de iNOS¹⁸⁴. La expresión de iNOS puede estar regulada a través de los factores de transcripción NFκB y STAT-1a. En la izquierda se muestra la vía de activación generada por el estímulo LPS. Al unirse éste al TLR4, promueve el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRAF6 y MyD88, provocando que MAPK activen al factor de transcripción NFκB y que éste se transloque al núcleo e induzca la expresión de iNOS. A la derecha se muestra la vía de activación generada por IFNγ. Cuando esta citoquina se une a su receptor, provoca la activación de las quinasas JAK que fosforilan al factor de transcripción STAT-1a, el cual se transloca al núcleo y participa en la expresión de IRF-1. Este nuevo factor de transcripción es el responsable de inducir finalmente la expresión de iNOS por medio de esta vía.

Dependiendo del agente de estimulación, la vía de señalización es diferente. El factor de transcripción NF- κ B se activa a través de los estímulos de LPS, IL-1 β y $\text{TNF}\alpha$. En el caso de M ϕ , el LPS se une al receptor TLR4 en la superficie de la membrana celular e induce el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRAF6, MyD88 y activación de MAPK o MEKK¹⁹¹. En estado de reposo, NF- κ B se encuentra unido al inhibidor κ B (I κ B). La activación de las quinasas inducidas por TLR4, provoca la fosforilación y activación de la quinasa I κ B (IKK), que fosforila a I κ B, haciendo que éste se separe del NF- κ B. A continuación, el NF- κ B libre se transloca al núcleo e induce la expresión del gen de iNOS por medio de su unión a la región

promotora del gen¹⁹¹. Cuando el agente de estimulación es el IFN γ , la vía implicada es la JAK/STAT-1 α ¹⁹². En ella, una vez que se produce la unión del IFN γ a su receptor, se provoca la activación de las quinasas Janus (JAK, JAK2), que se encargan de fosforilar al factor de transcripción STAT-1 α . Una vez fosforilado STAT-1 α , se transloca al núcleo donde promueve la síntesis del factor IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) que es el responsable de inducir la expresión del gen de iNOS, por medio de su unión a la región promotora del gen. Por último indicar que, la combinación de los diferentes agentes de estimulación pueden presentar un efecto sinérgico en la expresión de iNOS y consecuente producción de NO¹⁸⁴.

4.2.2. Estructura de iNOS y producción de NO

iNOS presenta un peso molecular de 131 kDa. Su forma activa consiste en un homodímero con un puente de zinc, estando constituido cada una de sus moléculas por un dominio C-terminal reductasa y un dominio N-terminal oxigenasa, separados por un dominio de unión a calmodulina¹⁹³ (Fig. 24).

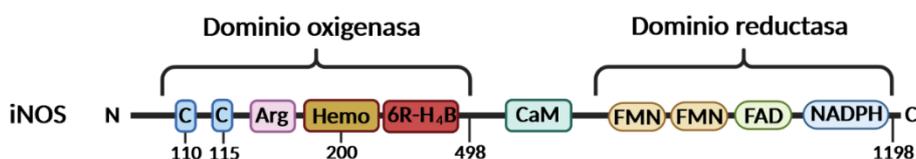


Figura 24. Esquema de la organización estructural de iNOS¹⁹⁴. iNOS es una proteína constituida por 1153 aminoácidos, presenta un dominio oxigenasa constituido por una zona con dos cisteínas (AA 110 y 115), un sitio de unión a L-arginina (Arg) un grupo Hemo y la secuencia de unión al cofactor 6R-H₄B. El dominio reductasa, se encuentra separado de la oxigenasa por una región de unión a Calmodulina (CaM) y está constituido por subdominios de unión a los cofactores FMN, FAD y NADPH.

La producción de NO (Fig. 25) se realiza por medio de la conversión de L-arginina a L-citrulina, estando este proceso ejecutado por una cadena de transporte de electrones en la que participan los cofactores NADPH, FAD y flavín monocucleótido (FMN) en el dominio reductasa, y el grupo hemo y 6R-H₄B ((6R)—5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina) del dominio oxigenasa¹⁸⁴.

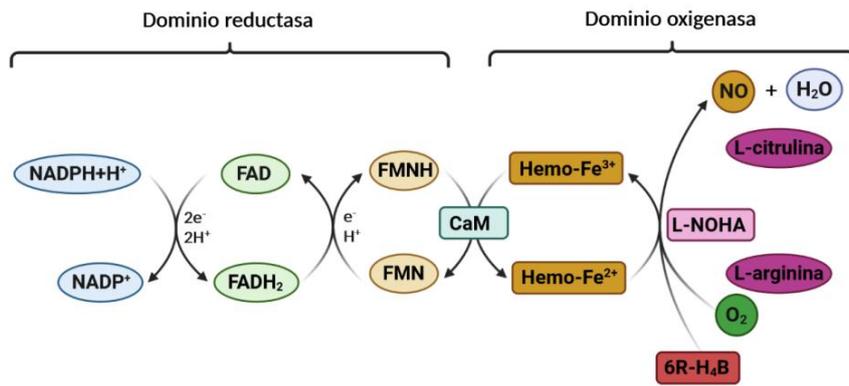


Figura 25. Esquema de la producción de NO a través de la transferencia de electrones mediada por iNOS¹⁸⁴. La transferencia comienza en el dominio reductasa desde el NADPH que a través de los cofactores FAD y FMN, llega hasta el grupo hemo localizado en el dominio oxigenasa. Posteriormente el grupo hemo reducido y por participación del 6R-H₄B y del oxígeno molecular, produce la conversión de L-arginina a L-citrulina, la consecuente producción de NO y liberación de una molécula de H₂O en el sitio activo de la enzima, con la participación de L-NOHA (N^ω-hydroxil-L-arginina).

La cantidad de NO producido por este sistema inducible en comparación con nNOS o eNOS es significativamente mayor, y su producción es mantenida hasta que la enzima es finalmente degradada al cabo de incluso horas¹⁸¹. Debido a su cantidad, el NO producido ayuda a los Mq en su capacidad microbicida para defenderse de microorganismos, además de ser fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria y el sistema inmunitario¹⁸⁴.

El mecanismo de producción de NO está muy regulado molecularmente, ya que una producción inapropiadamente alta, bien por sobreexpresión o desregulación de iNOS, puede tener efectos tóxicos sobre el hospedador, que pueden ir desde dolor, diabetes, desarrollo de cáncer y shock séptico^{195,196}.

5. Moléculas de la familia del SLAM

5.1. Características generales

La familia del SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) es un grupo de 9 receptores de membrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF, *immunoglobulin superfamily*)¹⁹⁷. También se las engloban dentro del subconjunto CD2/SLAM por la relación de CD48 con la molécula CD2 en ratón y CD2/CD58 en humanos¹⁹⁸. Esta familia está constituida por nueve miembros: **SLAMF1** (CD150, SLAM)^{197,199}, **SLAMF2** (CD48, BLAST1)^{200,201}, **SLAMF3** (CD299, Ly9)^{202,203}, **SLAMF4** (CD244, 2B4)^{204,205}, **SLAMF5** (CD84, Ly9B)²⁰⁰, **SLAMF6** (CD352, SF200 o NTB-A: *NK-T- and B-Cells Antigen* en humano, o Ly108 en ratón)^{206–208}, **SLAMF7** (CD319, 19A, CRACC: *CD2-like Receptor-Activating Cytotoxic Cells*, también llamado CS-1 o *mouse novel Ly9*)^{209,210}, **SLAMF8** (CD353, BLAME: *B-Lymphocyte Activator Macrophage Expressed*)²¹¹ y **SLAMF9** (CD84-H1, CD2F10, SF2001)^{208,212}.

La familia del SLAM fue inicialmente descrita como moléculas de adhesión capaces de participar en la sinapsis inmunológica de las células T con células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen-Presenting Cell*) y de las células NK (*Natural Killer*) con su célula diana²¹³ (Fig. 26).

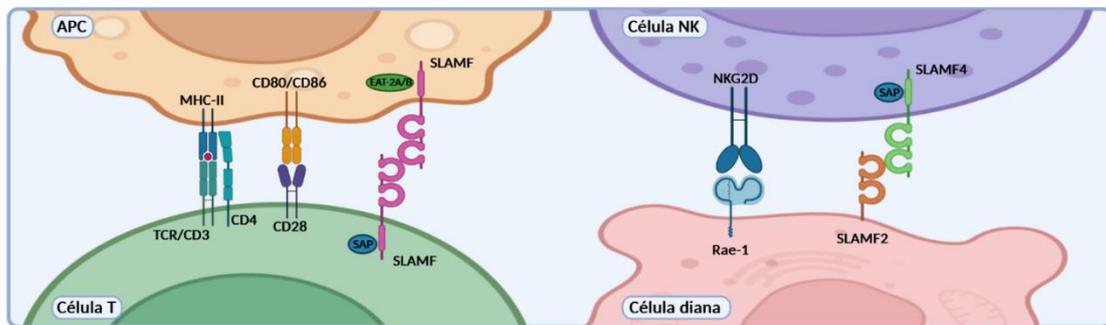


Figura 26. Ejemplo de la participación de los miembros de la familia del SLAM en la sinapsis inmunológica^{214,215}. A la izquierda se muestra la interacción entre células APC y células T, mientras que a la derecha se muestra la interacción entre las células NK y su célula diana. Ambas sinapsis se encuentran promovidas por miembros de la familia del SLAM. La interacción entre los receptores de la familia del SLAM de las células APC y las células T, provoca la fosforilación de las colas citoplasmáticas de estos receptores y la consecuente interacción de los adaptadores citoplasmáticos SAP o EAT-2. SAP es expresado en células T y EAT-2 en células APC y se encargan de activar a quinasas que modulan la activación celular por señales generadas a través del TCR y proteínas coestimuladoras como el CD28. La interacción entre SLAMF4 de la célula NK y SLAMF2 de la célula diana, promueve la fosforilación del dominio citoplasmático de SLAMF4 y la acción del adaptador citoplasmático SAP, aumentando la citotoxicidad y secreción de IFN γ inducida previamente por la activación mediada por el receptor NKG2D y el ligando Rae-1.

Diferentes estudios han demostrado que estos receptores también actúan como inmunomoduladores de diversas funciones, siendo capaces de controlar por medio de eventos de transducción de señales citoplasmáticas, respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, además de controlar la diferenciación y linaje de células hematopoyéticas^{214,216}. De hecho, los receptores de la familia del SLAM están relacionados tanto con funciones de activación como de inhibición en células T, NK y células B, formación de centros germinales, y mecanismos microbicidas en Mφ, neutrófilos y DC (**Tabla 5**).

Tabla 5. Funciones generales asociadas de los miembros de la familia del SLAM.

Miembro familia del SLAM	Determinadas mediante estimulación con anticuerpos ²¹⁴	Determinadas mediante fenotipo en ratones <i>Knockout</i> ^{217–219}
SLAMF1	Células T: ↑IFNγ Mφ: ↑IL-12 e IL-6 DC: ↑IL-12 e IL-8	Células T CD4: ↓IL-4 e IL-13, ↑IFNγ Células NKT: ↓desarrollo en conjunción con SLAMF6 Células GC T _{HH} : ↓IL-4 Mφ: ↓IL-12, TNFα, NO, maduración del fagosoma, migración al foco inflamatorio e ↑IL-6 DC: ↓migración al foco inflamatorio Plaquetas: ↓agregación
SLAMF2	Células T: ↓IL-2, IFNγ y proliferación (anticuerpos bloqueantes) Células B: ↓IL-13 por NK y ↓activación CD40L	Células T: ↓IL-2, y proliferación
SLAMF3	Células T: ↓IFNγ	Células T: ↓IL-4, IL-2 y proliferación
SLAMF4	Células T CD8: ↑citotoxicidad, IFNγ e IL-2 Células NK: ↑citotoxicidad e IFNγ Eosinófilos: ↑citotoxicidad, citoquinas y peroxidasa	Células T CD8 memoria: ↑expansión en infecciones víricas. Células NK: ↑citotoxicidad
SLAMF5	Células T: ↑proliferación e IFNγ	Células T-B: ↓adhesión celular, desequilibrio en células GC, ↓células T _{HH} e IL-21
SLAMF6	Células T: ↑IFNγ Células NK: ↑citotoxicidad e IFNγ	Células T: ↓IL-4 Neutrófilos: ↓eliminación bacterias, ROS y ↑IL-12, IL-6 y TNFα
SLAMF7	Células NK: ↑citotoxicidad Células B: ↑proliferación	Células T CD4: ↓IL-12, IFNγ y proliferación Células NK: ↓citotoxicidad, Flujo de Ca ²⁺
SLAMF8	ND	Mφ: ↑ROS, migración al foco inflamatorio Neutrófilos y DC: ↑migración al foco inflamatorio
SLAMF9	ND	ND

ND: No determinado.

Las funciones moduladoras de manera general, se llevan a cabo por la interacción diferencial de los miembros de la familia con adaptadores citoplasmáticos pertenecientes a la familia SAP (*SLAM-Associated Protein*), la cual incluye a: SAP (SH2D1A), *Ewing's sarcoma-Associated Transcript-2* (EAT-2 o SH2D1B1) y *EAT-2-Related Transducer* (ERT o SH2D1B2)²¹⁴. Estos adaptadores así como sus mecanismos de señalización y relación con los miembros de la familia del SLAM, serán explicados más adelante.

5.2. Localización cromosómica y patrón de expresión

Los genes que codifican para los miembros de la familia del SLAM se encuentran agrupados en un fragmento de aproximadamente 400 kb que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 en humano (1q23) y ratón (*locus* 1H2)^{213,220} (**Fig. 27**). Siete genes de los miembros de la familia del SLAM (SLAMF1-F7), se encuentran agrupados en un segmento genómico de 359 kb en humano y de 392 kb en ratón. Dicho segmento genómico se correspondería con el *locus* del *Slam*. La organización de los genes en humano y ratón es idéntica, con la diferencia en primer lugar de que la orientación es invertida en ambas especies, y en segundo lugar, el *locus* del *Slam* se encuentra cerca del centrómero en humanos, mientras que en el caso de ratón se encuentra cerca de la región telomérica^{213,214}.

Los genes humanos y murinos que codifican para los dos miembros restantes, SLAMF8 y SLAMF9, se encuentran localizados en la misma región cromosómica pero fuera del *locus* que contiene a los genes codificantes del resto de miembros de la familia^{214,221}. Los genes humanos y murinos que codifican para EAT-2 y ERT, se encuentran situados en tándem en el cromosoma 1, a una distancia de 1500 y 1300 kb del *locus* del *Slam*, en humano y ratón respectivamente²²². En humano cabe destacar que el gen codificante para ERT actúa como un pseudogen el cual no es funcional. El gen que codifica SAP, se encuentra situado en el cromosoma X tanto en humano como en ratón²¹⁵.

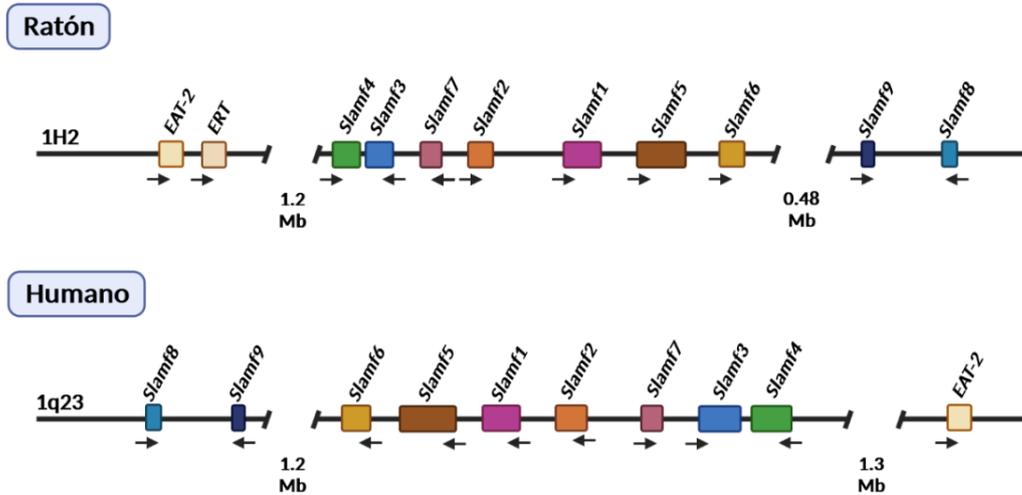


Figura 27. Organización genómica del locus del Slam en ratón y humano²¹³. Los genes que codifican para los miembros de la familia del SLAM se encuentran en el brazo largo del cromosoma 1 en humano (1q23) y ratón (*locus* 1H2). Siete de los genes que codifican para los miembros SLAMF1-F7, se encuentran situados en el centro del *locus* del Slam, agrupados en un segmento génico de 359 kb en humanos y 392 kb en ratón. SLAMF8 y SLAMF9, están localizados en la misma región cromosómica, pero fuera del *locus* del Slam. EAT-2 humano y de ratón, así como ERT de ratón, están también localizados cerca del *locus* del Slam. La disposición de los genes de la familia del SLAM, es idéntica en el genoma de humano y ratón, con la excepción de la orientación genética al centrómero, que es invertida. Los cuadrados representan las secuencias que contienen el conjunto de exones completos. Las flechas negras indican la dirección transcripcional de los genes.

Los genes que codifican para los miembros de la familia del SLAM, presentan secuencias conservadas de intrones y exones, por lo que comparten una estructura exón-intrón similar entre ellos (Fig. 28). Esto va a provocar que los diferentes miembros compartan características a nivel estructural y que éstas, sean representativas de los miembros de la familia del SLAM.

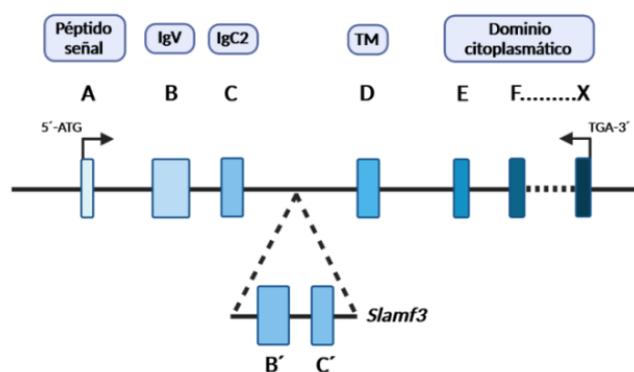


Figura 28. Organización y estructura característica exón-intrón de los miembros de la familia del SLAM²²⁰. El primer exón (A) contiene el codón ATG y las secuencias que codifican para el péptido señal. El segundo exón (B) produce el primer dominio IgV (dominio inmunoglobulina de tipo variable). El tercer exón (C) codifica para el dominio IgC2 (dominio inmunoglobulina de tipo constante). En el caso de SLAMF3, el segundo y tercer exón se encuentra duplicado (B' y C'), codificando dos dominios adicionales, uno IgV y otro IgC2. El exón (D) codifica la parte restante de la región extracelular y toda la región transmembrana (TM). Los exones contiguos (E, F, ..., X) codifican para la región citoplasmática. El último exón (X) contiene el codón de parada TGA. Los cuadrados representan las secuencias exónicas, mientras que las zonas con línea indican las secuencias intrónicas.

Los miembros de la familia del SLAM se expresan principalmente y de manera diferencial en la superficie de células de origen hematopoyético²¹⁴, encontrándose en células inmunitarias²¹⁵ aunque también se ha visto la expresión de SLAMF8 en células de origen mesenquimático, como son las células foliculares dendríticas (FDC, *Follicular Dendritic Cells*)²²³, células endoteliales y células fibroblásticas reticulares²¹⁹. Su patrón de expresión diferencial es el responsable de la función biológica específica de cada uno de los miembros de la familia, la cual va a variar dependiendo de la expresión, del tipo celular y del ambiente o contexto en el la célula se encuentre^{214,215,221}.

En la **tabla 6**, se muestra el patrón de expresión de los miembros de la familia del SLAM en diferentes tipos celulares.

Tabla 6. Patrón de expresión de los miembros de la familia del SLAM.

Miembro familia del SLAM	Patrón de expresión	Referencias
SLAMF1	HSC, timocitos (alto en Doble Positivos), células T y B (alto en activados), células T foliculares colaboradoras (T _{FH}), células T memoria, células <i>naive</i> B, células plasmáticas, centro germinal, DC, monocitos, Mφ y plaquetas.	197,216,232–237,224–231
SLAMF2	Ampliamente expresado en células hematopoyéticas, <i>Pan-leukocytes</i> , eosinófilos y mastocitos.	216,238–242
SLAMF3	HSC, timocitos (alto en Doble Negativos y Simple Positivos), células T, T _{FH} , células iCD8, células NKT, células B (alto en activados), NK (bajo), DC, monocitos y Mφ.	202,203,243–246
SLAMF4	Progenitores multipotentes hematopoyéticos (MHP), NK, NKT, células T y δ, células T CD8 activadas, células T CD8 memoria, linfocitos intraepiteliales (IELs) CD8, DC, monocitos, Mφ, basófilos, eosinófilos y mastocitos.	216,225,255,256,247–254
SLAMF5	Timocitos (alto en Simple Positivos), NK, NKT, células T, T _{FH} , células B (alto en activados), DC, monocitos, Mφ, plaquetas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, mastocitos y <i>Pan-leukocytes</i> .	200,203,260,261,225, 226,228,236,246,257–259
SLAMF6	Timocitos (alto en Doble Positivos), NK, células T, T _{FH} , NK, NKT, células B (alto en activados), DC (bajo), eosinófilos, neutrófilos y Mφ.	206,208,225,228,229,262–264
SLAMF7	NK, células T CD4 y CD8 activadas, células B, DC, monocitos y Mφ.	203,209,210,265–267
SLAMF8	Células T, células iCD8, células B, DC, monocitos, Mφ, neutrófilos, FDC, células endoteliales y células fibroblásticas reticulares.	219,223,268
SLAMF9	Células T, células B, DC y monocitos.	208,212,269,270

5.3. Organización estructural

Los miembros de la familia del SLAM presentan la estructura típica de glicoproteínas de tipo I, que se caracteriza por presentar las regiones: extracelular, transmembrana y citoplasmática, a excepción de SLAMF2, que se encuentra unido a la membrana plasmática por medio de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI, *Glycosil-Phosphatidyl-Inositol*) y carece de región citoplasmática^{238,271,272} (Fig. 29).

El dominio extracelular consiste en dos dominios: un dominio tipo inmunoglobulina distal a la membrana N-terminal de tipo variable (IgV) que no presenta uniones disulfuro, siendo este dominio el responsable del reconocimiento del ligando, y un dominio tipo inmunoglobulina próximo a la membrana C-terminal de tipo constante (IgC2), con dos uniones disulfuro por cisteínas conservadas^{198,213,221}. La única excepción a esta organización es la de SLAMF3, que presenta en la región extracelular cuatro dominios inmunoglobulina, resultante de una repetición en tándem de los dominios IgV-IgC2^{202,243}.

La región citoplasmática de seis de estos receptores: SLAMF1, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF6 y SLAMF7 portan una o más copias de un motivo ITSM (*Intracelullar Tyrosine-based Switch Motif*)^{213,214,273-275}. El motivo ITSM se caracteriza por la secuencia: TxYxxI/V, siendo T: treonina; Y: tirosina; I: isoleucina; V: valina; y x: cualquier aminoácido²²¹. Dicho motivo tiene una alta afinidad por el dominio SH2 (*Src Homology 2*) de SAP y/o EAT-2^{224,276-278}. SLAMF2 carece de región citoplasmática, por lo tanto, no presenta motivos ITSM. SLAMF8 y SLAMF9, aun teniendo una corta porción citoplasmática de aproximadamente 30 aminoácidos, carecen de motivos ITSM^{208,210-212,269}.

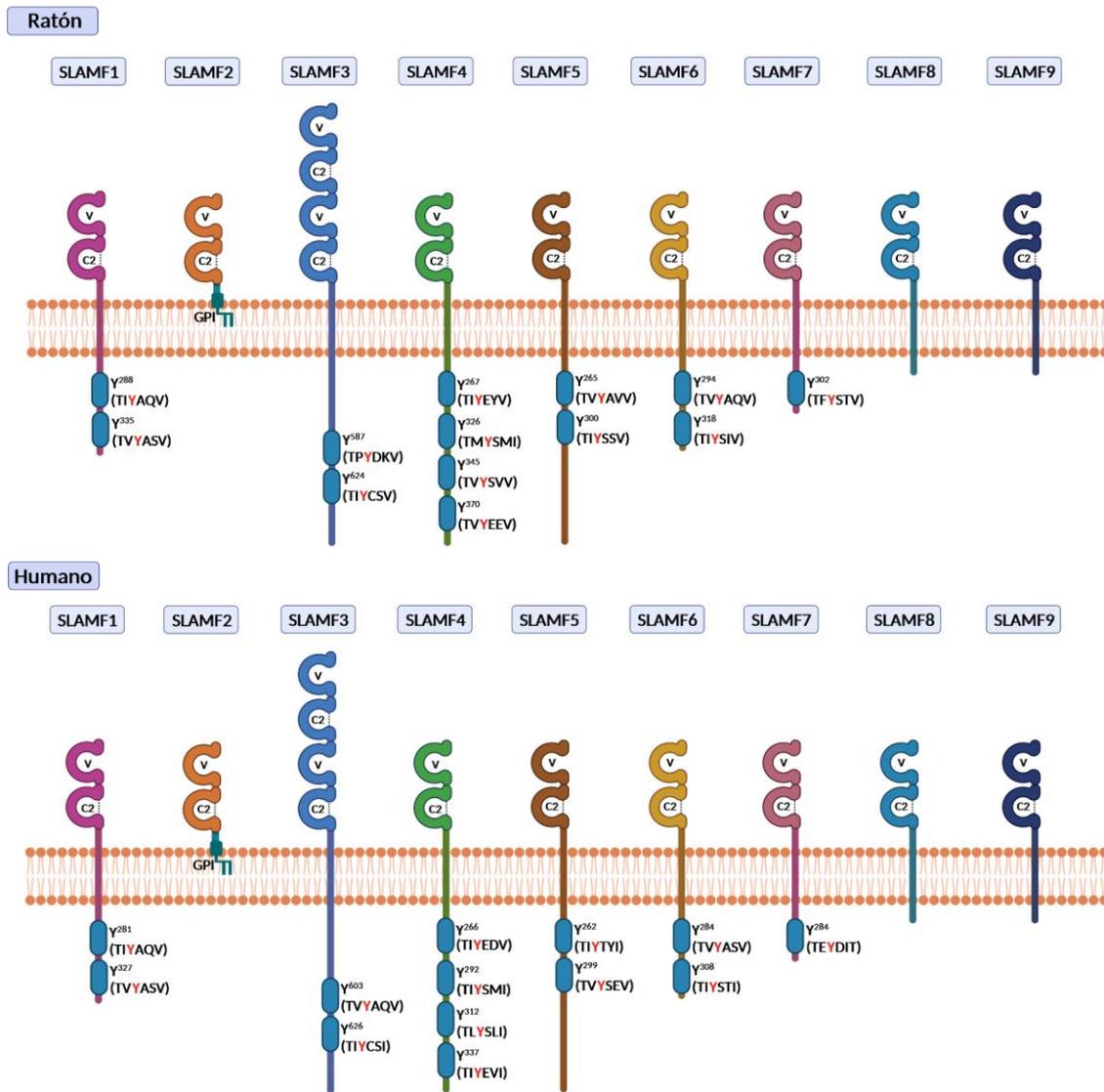


Figura 29. Organización estructural de los miembros de la familia del SLAM en ratón y humano^{221,279,280}. Los miembros de la familia del SLAM tienen una estructura típica de glicoproteínas de tipo I. Todos presentan un dominio inmunoglobulina distal a la membrana de tipo variable (V) y un dominio inmunoglobulina próximo a la membrana de tipo constante (C2) con dos uniones disulfuro por cisteínas conservadas (zona de puntos en dominios C2), a excepción de SLAMF3 que presenta cuatro dominios inmunoglobulina. Todos los miembros de la familia del SLAM presentan una zona transmembrana de anclaje, menos SLAMF2 el cual se une a la membrana por medio de GPI, siendo este miembro además, carente de región citoplasmática. Los miembros que presentan región citoplasmática portan una o más copias de un motivo ITSM (azul). Al lado de cada motivo ITSM, se indica la posición del aminoácido tirosina (Y) susceptible de fosforilación, además de la localización de Y dentro de la secuencia ITSM (en rojo). SLAMF8 y SLAMF9 presentan una corta región citoplasmática, pero ambos carecen de motivos ITSM. La figura muestra algunas de las isoformas representativas de los miembros de la familia del SLAM de ratón y humano.

5.4. Ligandos

La mayoría de los receptores de la familia del SLAM presentan como ligandos a los propios miembros de la familia. Esta interacción ligando propia, se denomina **interacción endofílica** y se lleva a cabo entre los dominios IgV de la región extracelular de los miembros participantes. Esta unión es la responsable de la función de interacción en la sinapsis inmunológica entre células²⁸¹⁻²⁸³. Además, se sabe que algunos de los miembros de la familia del SLAM presentan afinidad de unión por estructuras de microorganismos. Esta interacción es la conocida como **interacción xenofílica**²⁸⁴.

5.4.1. Interacción endofílica

La interacción endofílica puede ser a su vez de dos tipos: **homofílica**, entre los mismos miembros de la familia, y **heterofílica**, entre diferentes miembros.

Como interacciones homofílicas nos encontramos las generadas entre SLAMF1, SLAMF3, SLAMF5, SLAMF6, SLAMF7 y SLAMF8^{219,285}. En las interacciones heterofílicas nos encontramos con la generada entre SLAMF4 en las células NK con SLAMF2 de la células diana²⁸⁵. Hasta la fecha se desconoce el ligando para SLAMF9, aunque se ha sugerido interacción heterofílica por algunos autores en ratón²⁸⁶, no confirmada por otros²⁸⁷.

SLAMF2 puede además interactuar con CD2, por lo que compite con CD58 en humano (no se conoce el homólogo de CD58 en ratón). Los datos estructurales indican que, a excepción de SLAMF3, las interacciones homofílicas entre las células T y células APC, e interacciones heterofílicas entre las células NK y células diana, presentan una distancia de aproximadamente 105 a 130 Å^{232,281-283,288}.

5.4.2. Interacción xenofílica

Además de interactuar entre ellos, algunos miembros de la familia del SLAM tienen la capacidad de interactuar con ciertas estructuras de microorganismos. SLAMF1 interactúa con la hemaglutinina del virus del sarampión (MV-H) además de con otros morbillivirus, lo que facilita la entrada del virus, así como la fusión celular, siendo esta interacción beneficiosa para el patógeno^{234,289,290}.

Otros estudios han demostrado interacciones de: SLAMF1 con las porinas de la membrana externa, OmpC y OmpF de bacterias Gram negativas²³⁰, SLAMF2 con FimH, una lecitina presente en los *pili* de enterobacterias²³⁹ y SLAMF6 con *Salmonella typhimurium*²⁹¹, siendo en estos casos beneficiosas para el huésped²⁸⁴. Debido por tanto al tipo de ligando con el que

interaccionen, la deficiencia de alguno de los miembros de la familia del SLAM puede hacer que la célula hospedadora se convierta en resistente o susceptible frente a ciertos patógenos.

A continuación, en la **tabla 7** se recoge toda la información referente a los tipos de ligandos de la familia del SLAM, además de indicar su efecto en la célula hospedadora en caso de su deficiencia.

Tabla 7. Ligandos de los miembros de la familia del SLAM y efectos en la célula hospedadora²⁸⁴.

Miembro familia del SLAM	Ligando familia del SLAM	Ligando microbiano	Deficiencia del miembro genera resistencia a:	Deficiencia del miembro genera susceptibilidad a:
SLAMF1	SLAMF1	Hemaglutinina del virus del sarampión, <i>Escherichia coli</i> (OmpC/F+), <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Bacterias Gram -, <i>L. major</i>
SLAMF2	SLAMF4, CD2	<i>E. coli</i> (FimH ⁺)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterobacterias FimH ⁺
SLAMF3	SLAMF3	-	-	MCMV
SLAMF4	SLAMF2	-	-	LCMV, γ HV68
SLAMF5	SLAMF5	-	-	-
SLAMF6	SLAMF6	<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Leishmania mexicana</i> , <i>C. rodentium</i>	<i>S. typhimurium</i>
SLAMF7	SLAMF7	-	-	-
SLAMF8	SLAMF8	-	-	-
SLAMF9	ND	-	-	-

ND: No determinado; MCMV: Citomegalovirus murino; LCMV: Virus de la coriomeningitis linfocítica; γ HV68: Gamma-herpes virus 68 murino.

5.5. Señalización celular

Los miembros de la familia del SLAM que portan en sus regiones citoplasmáticas una o más copias de un motivo ITSM, como son: SLAMF1, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF6 y SLAMF7, interaccionan con los adaptadores citoplasmáticos que pertenecen a la familia SAP, la cual incluye a SAP, EAT-2, y en ratón a ERT²¹⁴. Posteriormente estos adaptadores interactuarán con proteínas efectoras para ejercer la correspondiente función moduladora.

SAP, EAT-2 y ERT, presentan un dominio SH2 y una secuencia C-terminal corta^{222,292}. El dominio SH2 es el responsable de la interacción con la región citoplasmática de los miembros de la familia del SLAM, ya que tiene una alta afinidad por los residuos tirosina fosforilados de los motivos ITSM^{221,224,276-278}.

El patrón de expresión de las proteínas adaptadoras de la familia de SAP parece estar restringido según el tipo de célula inmunitaria. En la **tabla 8**, se recoge el patrón diferencial de expresión celular y los miembros de la familia del SLAM con los que interactúan.

Tabla 8. Patrón de expresión de las proteínas adaptadoras de la familia de SAP^{215,221}.

Miembro familia de SAP	Patrón de expresión	Miembros de la familia del SLAM a los que se unen
SAP	Células T, NK, NKT, eosinófilos, plaquetas, células B transformadas y líneas de células B, pero no en células B normales.	SLAMF1, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF6, SLAMF7 (en humano)
EAT-2	NK, DC, CD8 humanas, células T y B activadas, Mφ y plaquetas.	SLAMF1, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF7
ERT	NK de ratón.	SLAMF4, SLAMF7

5.5.1. Señalización a través de SAP

Aunque la mayoría de los dominios SH2 requieren de residuos tirosina fosforilados en los motivos ITSM para unirse, SAP es capaz de unirse al ITSM próximo a la membrana de la región citoplasmática de SLAMF1 por medio de un mecanismo denominado *three-pronged binding mechanism*. La estructura resultante de esta unión, estabiliza la interacción con los residuos tirosina no fosforilados, generando una unión más fuerte cuando dichos residuos se fosforilan^{277,278,293,294}. Para el resto de los miembros de la familia del SLAM que presentan motivos ITSM: SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5 y SLAMF6^{207,295}, es necesaria la fosforilación de los residuos en tirosina de éstos, para que se establezca la asociación con el dominio SH2 de SAP.

En un principio no se tenía claro como SAP era capaz de participar en los eventos de transducción de señales a través de su interacción con proteínas efectoras. Existen varias ideas al respecto.

Una primera idea (**Fig. 30**), se basa en el hecho de que el dominio SH2 presente en SAP se encuentra en otros tipos de proteínas que tienen funciones adaptadoras y/o actividad enzimática (quinasa o fosfatasa) y con afinidad hacia motivos ITSM. Esto hacía pensar que SAP podía competir por la unión a los miembros de la familia del SLAM con otras proteínas que presentan dominios SH2²²⁴. Por esta razón, los motivos con residuos en tirosina susceptibles de fosforilación y con capacidad de unión con los miembros de la familia SAP se han denominado ITSM, para diferenciarlos de los motivos ITAM que reclutan Syk quinasas, e ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motifs*) que reclutan fosfatasas²⁹⁶.

Esta hipótesis tiene su justificación en el hecho de que se ha observado que SAP es capaz de bloquear el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 (*SH2 domain-containing protein Tyrosine Phosphatase*) a los motivos ITSM fosforilados de SLAMF1²²⁴, y de las fosfatasas SHP-1 y/o SHP-2 hacia los motivos ITSM fosforilados de los miembros SLAMF1, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5 y SLAMF6 en células NK y CD8, mediante ensayos de sobreexpresión de SAP^{205,207,224,233,244,297-301}.

Otra idea sobre el mecanismo de acción de SAP, se basa en que este adaptador es capaz de reclutar a la quinasa Fyn (miembro de la familia de las Src quinasas), hacia los motivos ITSM de SLAMF1^{302,303}, SLAMF4²⁷⁹ y SLAMF6²⁹⁵. Esta quinasa fosforilaría los residuos de tirosina de los motivos ITSM de esos miembros y posteriormente reclutarían proteínas efectoras.

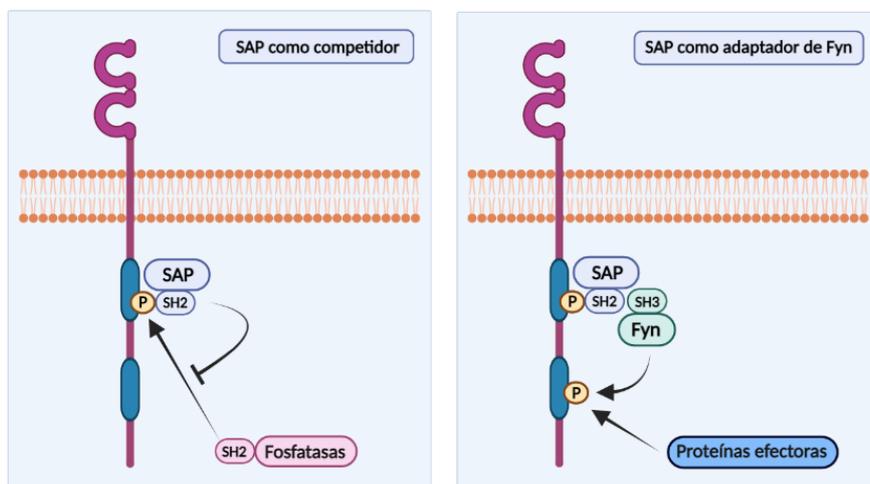


Figura 30. Esquema general del mecanismo de señalización dual de la proteína adaptadora SAP²¹⁷. En la derecha se muestra como SAP es capaz de bloquear la asociación de fosfatasas al motivo ITSM fosforilado en tirosina, por su unión a través del dominio SH2. En la izquierda se muestra como SAP actúa como adaptador de Fyn, que por su acción quinasa fosforilaría residuos de tirosina en otros ITSM favoreciendo la unión de otras proteínas adaptadoras.

Las dos ideas de acción de SAP: competidor por los ITSM y adaptador de Fyn, no son excluyentes la una de la otra ya que contribuyen a la variabilidad de efectos de señalización de la familia del SLAM en presencia o ausencia de SAP³⁰¹.

Además de la interacción con Fyn, una vez fosforilados los motivos ITSM de los receptores se pueden reclutar otras proteínas efectoras como son: SHIP, Dok1 (*Docking protein 1*), Dok2, Ras-GTPasas³⁰³, AKT^{304,305}, Vav1, LAT, PLC γ , que regulan diferentes vías de activación a través de PI3K, ERK, Bcl-10 y NF- κ B³⁰⁶⁻³⁰⁹. La interacción con estas proteínas efectoras y el mecanismo de activación está restringido al tipo celular y al miembro de la familia del SLAM.

5.5.2. Señalización a través de EAT-2 y ERT

EAT-2 es reclutada a los motivos ITSM de SLAMF1, SLAMF3²⁷⁶, SLAMF4^{276,310,311}, SLAMF5^{276,311,312} y SLAMF7³¹⁰, pero a pesar de compartir aproximadamente un 50% de similitud con SAP, EAT-2 presenta características propias de unión a los motivos ITSM.

En primer lugar, sus motivos ITSM de unión en los miembros SLAMF4, SLAMF5 y SLAMF6, son diferentes de los motivos ITSM de unión para SAP^{276,312,313} y en segundo lugar, la unión es fosfotirosina dependiente²⁷⁶.

EAT-2 y ERT presentan en el extremo C-terminal residuos de tirosina susceptibles de fosforilación que son necesarios para ejercer la señalización celular. En el caso de ratón, EAT-2 y ERT tienen dos tirosinas, mientras que el EAT-2 humano solamente una. Se ha observado por medio de experimentos de sobreexpresión, que Fyn es capaz de asociarse con EAT-2 a través de sus residuos tirosina fosforilados^{222,314} y que se une directamente al dominio catalítico de las quinasas de la familia Src, Fyn, Hck, Lyn, Lck y Fgr²²². Estos datos indican que EAT-2 y ERT son capaces de hacer interactuar a los miembros de la familia del SLAM con quinasas de la familia Src por una vía diferente a como lo hace SAP²²¹. Además de esta interacción, EAT-2 es capaz de mediar en la participación de Vav1^{310,311} y PLC γ ³¹⁵ (Fig. 31).

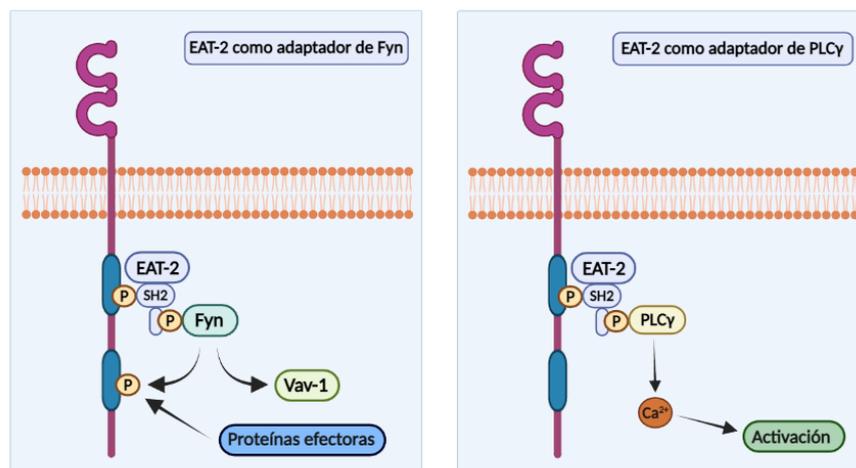


Figura 31. Esquema general del mecanismo de señalización dual de la proteína adaptadora EAT-2²¹⁷. En la derecha se muestra como EAT-2 se une al motivo ITSM fosforilado en tirosina a través de su dominio SH2 y como establece una interacción con la quinasa Fyn. Esta asociación permite que Fyn fosforile a Vav-1 y a residuos de tirosina en otros ITSM, lo que permite la unión de otras proteínas adaptadoras favoreciendo la activación de vías transducción de señales. En la izquierda se muestra como EAT-2 puede unirse a la PLC γ y como ésta por medio de su participación en la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico al citosol, promueve la activación celular.

Como se indicó anteriormente, SLAMF2, SLAMF8 y SLAMF9 son miembros de la familia del SLAM que no presentan motivos ITSM. De ellos, SLAMF8 y SLAMF9, no se asocian a moléculas adaptadoras ya que presenta una cola citoplasmática corta que no presenta ningún motivo característico de unión a proteínas. Por el contrario, SLAMF2 que se encuentra anclado a la membrana plasmática por medio de GPI, se ha visto que está asociado a balsas lipídicas y que induce la fosforilación de Lck después de la interacción con el ligando CD2³¹⁶.

5.6. Funciones biológicas de los miembros de la familia del SLAM frente a bacterias patógenas en macrófagos

Los miembros de la familia del SLAM son capaces de modular un amplio rango de funciones como el desarrollo de células mieloides y linfocitos, y la respuesta de células T y B a bacterias y parásitos. Además, varios miembros de la familia del SLAM tienen la peculiaridad de actuar específicamente como sensores microbianos, regulando negativa o positivamente la función en M ϕ , DC, neutrófilos y células NK, en respuesta a estímulos de origen microbiano²⁸⁴.

A continuación, se detallarán las funciones de los miembros de la familia del SLAM asociadas a respuestas con microorganismos en M ϕ . Dado que SLAMF8 es objeto de estudio en esta tesis doctoral, sus características y funciones asociadas serán detalladas en un punto específico.

5.6.1. SLAMF1

SLAMF1 es capaz de interactuar con las porinas de la membrana externa, OmpC y OmpF, de bacterias Gram negativas, lo que provoca una fagocitosis más efectiva en M ϕ ²³⁰. Además, se ha comprobado que la interacción de SLAMF1 con estos elementos, resulta en el reclutamiento de la proteína Beclin-1 que promueve la formación del complejo Vps34-Vps15 y UVRAG³¹⁷. A continuación, dada la actividad quinasa de Vps34, se acumula PtdIns3P en la membrana del fagosoma⁶⁶. Esta acumulación tiene un doble efecto, en primer lugar, favorece el ensamblaje de NOX2³¹⁸ y en segundo lugar, participa en la interacción con EEA1 promoviendo el desarrollo del proceso de maduración del fagosoma⁶⁷. Debido a estas interacciones demostradas, la ausencia de SLAMF1 en M ϕ provocaría una falta de eficiencia en el proceso de fagocitosis y en la capacidad microbicida del M ϕ frente a bacterias Gram negativas²⁸⁴.

Además de esta interacción, se ha demostrado que SLAMF1 participa en la señalización mediada por TLR4 en M ϕ infectados con *E. coli*, ya que es capaz de controlar el tráfico de vesículas al fagosoma por medio de la interacción con TRAM y la pequeña GTPasa Rab11³¹⁹.

A nivel de producción de citoquinas, se ha observado que M ϕ deficientes en SLAMF1 muestran una menor producción de IL-12, TNF α y NO en comparación con los M ϕ no deficientes, cuando son estimulados con LPS e IFN γ ²³⁷. Este nivel de producción de citoquinas es mayor al observado mediado por SLAMF1 en la interacción entre DC y células que expresan CD40-L³²⁰. Esta diferencia podría sugerir que SLAMF1 desempeña diferentes funciones a nivel de producción de citoquinas en M ϕ , dependiendo si SLAMF1 participa en interacciones de tipo homofílica y/o xenofílica²⁸⁴. También se ha demostrado que SLAMF1 es necesario para la producción de IFN β mediada por TLR4 en M ϕ infectados con *E. coli*³¹⁹.

5.6.2. SLAMF2

El SLAMF2 es capaz de reconocer a *E. coli* a través de FimH, una lecitina presente en los *pili* de enterobacterias²³⁹. Este reconocimiento no está mediado por opsoninas y genera una balsa lipídica rica en colesterol que facilita la fagocitosis del microorganismo³²¹. Esta interacción es importante en la fagocitosis de bacterias FimH⁺ que aún no hayan sido opsonizadas y que estén adheridas a las superficies de los tejidos³²². Además, su ausencia en M ϕ estimulados con LPS genera una menor producción de IL-12 y TNF α en comparación con los M ϕ no deficientes³²³. También se ha demostrado la importancia de SLAMF2 en la capacidad microbicida de M ϕ , en la interacción de éstos con células T y en el desarrollo de colitis experimental³²³.

El reconocimiento de FimH por parte de SLAMF2, no está restringido únicamente en M ϕ , ya que se ha observado que es capaz de reconocer a esta lecitina en mastocitos de ratón derivados de médula ósea (BMMCs, *Bone Marrow Mast Cells*), de rata y humano. Este reconocimiento provocaría una activación independiente de IgE produciendo la degranulación de la célula, secreción de TNF α y endocitosis de la bacteria²⁴².

Además del papel de SLAMF2 en el reconocimiento de bacterias Gram negativas, también se ha visto que es capaz de mediar y promover la activación de eosinófilos producida por *S. aureus* en el contexto de la dermatitis atópica²⁴¹ y de tener algún tipo de función en el reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en mastocitos³²⁴.

5.6.3. SLAMF5

No se han encontrado hasta la fecha interacciones de SLAMF5 con elementos específicos de microorganismos, pero se ha comprobado que afecta a las funciones fagocíticas. La estimulación con LPS provoca la fosforilación de SLAMF5, aumentando la producción de la

proteína quimioatrayante de monocitos 1 (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) y TNF α vía NF- κ B. Esto indicaría el papel de SLAMF5 en la activación de M ϕ ³²⁵.

5.6.4. SLAMF9

El SLAMF9 se describe como una molécula capaz de mediar en la eliminación de *Salmonella typhimurium*, ya que se ha observado una menor capacidad microbicida en hígados de ratones deficientes para SLAMF9 después de una infección sistémica, en comparación con ratones no deficientes. En la línea tumoral monocítica humana THP-1 diferenciada a M ϕ , se ha visto que SLAMF9 es esencial en la producción de GM-CSF, TNF α e IFN β , ya que células deficientes en SLAMF9 presentan una menor producción de estas citoquinas, en comparación con las no deficientes²⁸⁷.

Además de participar en el inicio de procesos inflamatorios y eliminación de microorganismos en M ϕ , SLAMF9 es capaz de regular la diferenciación y función de células dendríticas plasmacitoides (pDC, *plasmacytoid Dendritic Cells*). Se ha observado que la ausencia de este miembro de la familia del SLAM en ratones conduce a la acumulación en médula ósea de estas células en un estado de inmadurez y a una reducción de los niveles de producción de IFN α y TNF α bajo la estimulación con CpG. Además de esta función, se ha estudiado su papel en un modelo experimental murino de encefalomiелitis autoinmune (EAE, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), modelo experimental de esclerosis múltiple en humanos, sugiriendo que SLAMF9 puede tener un papel sobre esta enfermedad, ya que su ausencia produce un efecto protector durante el desarrollo de la EAE²⁷⁰.

Por otro lado, Zeng *et al.* (2020) describen una función conjunta de SLAMF9 con SLAMF8 en un modelo de sepsis con LPS²⁸⁶, que se comenta en el siguiente punto.

5.7. SLAMF8

SLAMF8 es uno de los últimos miembros descritos de la familia del SLAM. Se encuentra codificado en el brazo largo del cromosoma 1 en humano (1q23) y ratón (*locus 1H2*). Como el resto de los miembros de la familia, es una glicoproteína de membrana caracterizada por presentar una región extracelular, una transmembrana y una citoplasmática (**Fig. 32**). La región extracelular presenta unos 212 aminoácidos y está constituida por un dominio inmunoglobulina distal a la membrana, N-terminal de tipo variable (IgV) sin puente disulfuro, y un dominio inmunoglobulina próximo a la membrana, C-terminal de tipo constante (IgC2) con dos uniones disulfuro por cisteínas conservadas. La región transmembrana está constituida por 21 aminoácidos y la citoplasmática por 31 aminoácidos, caracterizándose éste por la ausencia

de motivos ITSM o por secuencias de transmisión de señales. La secuencia de aminoácidos entre humano y ratón presenta una similitud del 75%, presentando un alto nivel de homología en su región extracelular con SLAMF2 y CD58^{211,214}.

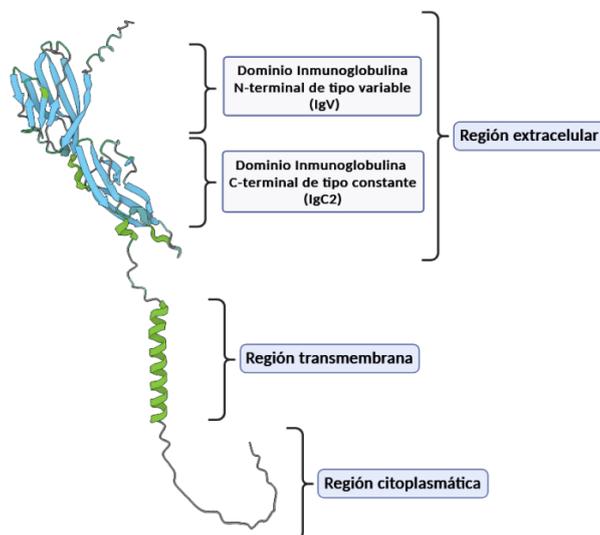


Figura 32. Estructura tridimensional de SLAMF8 humano. La imagen muestra las regiones y estructuras secundarias de SLAMF8 humano (*Uniprot Identifier: Q9P0V8*). En verde se identifican las α -hélices y en azul las láminas- β beta. Imagen obtenida de *AlphaFold Protein Structure Database* (EMBL-EBI).

Según los estudios, la interacción de SLAMF8 es de tipo homofílica²¹⁹ y la expresión de este receptor se induce mediante estímulos de bacterias Gram negativas y positivas, LPS e IFN γ en neutrófilos, M ϕ y DC^{211,218}.

SLAMF8 se ha descrito como un regulador negativo de NOX2 en M ϕ de ratón. Esta función ha sido demostrada empleando ratones deficientes en SLAMF8, en los que se ha observado un aumento de la fosforilación de p40^{phox} a través de la PKC δ , lo que induce también un aumento en la producción de ROS, en comparación con ratones no deficientes^{218,219}. También se ha demostrado que la ausencia de SLAMF8, genera fagosomas menos acidificados, independientemente si portan Gram negativas o positivas²¹⁸. Además de estas funciones, se ha descrito que SLAMF8 actúa como un regulador negativo en la migración de neutrófilos, M ϕ y DC al foco inflamatorio²¹⁹.

Debido a estas funciones, y a que SLAMF1 actúa como un regulador positivo en la capacidad microbicida del M ϕ ²⁸⁴ y en la migración de células al foco inflamatorio²¹⁹, se ha propuesto que SLAMF1 y SLAMF8 pueden ejercer un mecanismo “reostático” capaz de modular la inflamación en las diferentes etapas del proceso de infección (**Fig. 33**). Este hecho se respalda aún más por

la expresión diferencial en el tiempo de SLAMF1 y SLAMF8, en el proceso de inflamación de origen infeccioso²¹⁹.

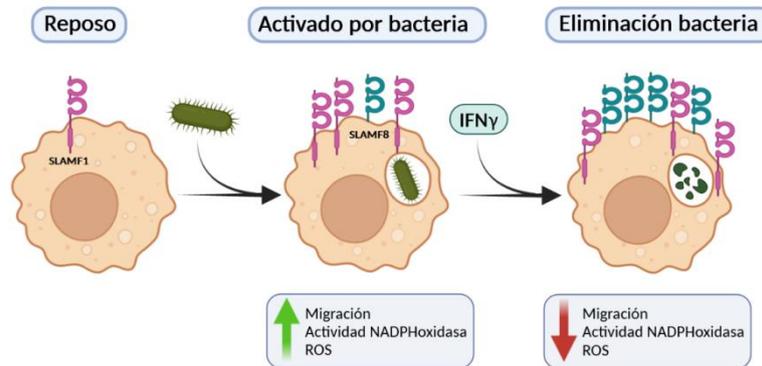


Figura 33. Modelo propuesto de la acción de SLAMF1 y SLAMF8 sobre la regulación de la producción de ROS por NOX2 y la migración celular²¹⁹. En primer lugar, el proceso inflamatorio aumentaría la expresión de SLAMF1, generando una producción de ROS por NOX2 y un aumento de la capacidad de migración de los fagocitos al foco inflamatorio. Posteriormente, los mediadores inflamatorios como el IFN γ provocarían un aumento de expresión de SLAMF8, que conduciría a una disminución tanto de la producción de ROS por su acción de regulación negativa sobre NOX2, como de la capacidad de migración de los fagocitos.

Además de esta función asociada con SLAMF1, Zeng *et al.* (2020) describen recientemente que SLAMF8 parece actuar junto a SLAMF9 en M ϕ ²⁸⁶. Por medio del empleo de ratones deficientes para ambos receptores, muestran que la ausencia de éstos protege contra lesiones hepáticas inducidas por LPS mediante la regulación de la expresión de TLR4. Este efecto de protección estaría promovido por una menor infiltración de células inflamatorias, producción de citoquinas TNF α , IL-1 β e IL-6 y activación de la vía iniciada por TLR4²⁸⁶.

Por último, es importante indicar que SLAMF8 no solamente parece tener un papel en los procesos de inflamación de origen infeccioso, ya que se ha visto su relevancia en diferentes tipos de cáncer, al igual que ocurre con otros miembros de la familia del SLAM (**Tabla 9**). Se ha observado su expresión y papel en mastocitosis humanas originadas por la ruta oncogénica KIT(CD117)-RAS-RAF-ERK, vía SHP-2³²⁶. También, se ha visto su posible papel en linfomas anaplásicos de células grandes, ya que por medio del empleo de shRNA (*short hairpin RNA*) para silenciar la expresión génica de *Slamf8* en líneas celulares de este tipo de tumor, se ha conseguido reducir la activación de SHP-2, la proliferación y aumentar la apoptosis³²⁷.

Además, SLAMF8 también ha mostrado ser un biomarcador para algunos tipos de tumores. Tal es así, que se propone como un biomarcador de gliomas de subtipo mesenquimal, para indicar una progresión maligna, y estar relacionado con la supervivencia global y resistencia a

quimioterapia para este tipo de cáncer³²⁸. Para el caso de cáncer gástrico se ha observado que altos niveles de expresión de SLAMF8, son indicativos de una posible mejor eficacia de inmunoterapia anti-PD1 en éste³²⁹. También se ha observado que su expresión puede indicar una buena eficacia de la inmunoterapia para el cáncer de pulmón de células no pequeñas³³⁰. Recientemente, Zhang *et al.* (2023) han propuesto a SLAMF8 como un marcador de pronóstico en cáncer colorrectal, indicando que una alta expresión de SLAMF8 está asociada con una baja supervivencia global³³¹.

Tabla 9. Miembros de la familia del SLAM y asociación con el cáncer.

Miembro familia del SLAM	Tipo de cáncer con el que se asocia y posibilidades terapéuticas	Referencias
SLAMF2	Su alta expresión está asociada con la progresión maligna e inmunomodulación de glioma. Se propone como diana terapéutica bloqueándolo junto con PD-L1, a modo de inmunoterapia.	332
	Se encuentra expresado altamente en mieloma múltiple. El uso de anticuerpos conjugados con fármacos frente a este miembro está en evaluación.	333
SLAMF3 y SLAMF4	Su expresión promueve la linfocitosis hemofagocítica. Se propone como diana terapéutica, ya que su bloqueo promueve la fagocitosis de células tumorales hematopoyéticas.	334
	SLAMF3 se encuentra altamente expresado y de manera constitutiva en mieloma múltiple. Actúa transmitiendo señales a través de la vía MAPK/ERK. Además, se ha detectado su forma soluble en estadios avanzados de este tipo de cáncer.	333
SLAMF5	Su expresión es baja en células de mieloma múltiple, pero es altamente inducida por estas células a través de la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos MIF (<i>Macrophage migration Inhibitory Factor</i>) en las células del microambiente. Esto conduce a un aumento de células supresoras de estirpe mieloide monocíticas y granulocíticas (M-MDSCs y G-MDSCs, respectivamente) y a un aumento de expresión de PD-L1, que suprime la función de células T. Por este motivo, se ha propuesto a SLAMF5 como diana terapéutica, bien bloqueándolo o reduciendo su expresión en el ambiente tumoral.	335
SLAMF6	Se encuentra expresado altamente en mieloma múltiple. El uso de anticuerpos conjugados con fármacos frente a este miembro está en evaluación.	333
SLAMF7	Promueve la fagocitosis de células tumorales hematopoyéticas, vía independiente de SAP. Su expresión en tumores de este tipo, podrían responder mejor a terapia basada en el bloqueo de la interacción SIRP- α (receptor inhibitorio de fagocitosis presente en M ϕ) y CD47 (ligando expresado en las células tumorales).	336
	Expresado en células T CD8 de pacientes con melanoma que no responden a inmunoterapia.	337
	Su expresión está asociada con baja supervivencia en carcinoma renal de células claras.	338
	Su alta expresión junto con la de EAT-2, está asociada con una mejor evolución en pacientes con neuroblastoma de alto riesgo. Además, se ha propuesto como diana terapéutica.	339
	Su estado altamente glicosilado evita la fagocitosis de células tumorales de mama. Su desglicosilación promovida por anticuerpos anti-SLAMF7 conjugados con el inhibidor de glicosilación NGI-1 (<i>N-linked Glycosylation Inhibitor-1</i>), actúan sobre STT3A (<i>STT oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit A</i>). De esta forma se evita la glicosilación de SLAMF7 y se promueve la fagocitosis de células tumorales.	340
	Altamente expresado en mieloma múltiple. Por medio de un anticuerpo monoclonal humanizado, elotuzumab, se promueve a la citotoxicidad de las células tumorales a través de células NK.	341
SLAMF8	Expresado en mastocitosis humanas. En linfomas anaplásicos de células grandes, su silenciamiento puede reducir la proliferación y promover la apoptosis. Actúa como biomarcador de progresión y eficacia de tratamiento en gliomas de subtipo mesenquimal, cáncer gástrico y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Recientemente se ha establecido como un marcador de pronóstico en cáncer colorrectal.	326–331

AIMS

Known the negative regulatory function of SLAMF8 on NOX2 through PKC²¹⁸ and the probable involvement of p38 MAPK³⁴² in mouse macrophages and its possible participation in the inflammatory response²¹⁹, we set out to study in depth the regulatory role of SLAMF8 on NOX2 activation through direct and indirect PKC pathways, as well as its impact on macrophage activation and on microbicidal mechanisms in the progression of severe infections. Finally, given its function in mouse macrophages, we analyzed its possible role in human macrophages.

To these studies, we propose the following aims:

1. Analysis in depth of the SLAMF8 modulation in NOX2 activation pathways through PKC, p38 MAPK and PI3K, and the assembly of this complex at the cell membrane in mouse peritoneal macrophages.
2. Determination of the effect of SLAMF8 on actin cytoskeleton reorganization in mouse peritoneal macrophages.
3. Study of SLAMF8 modulation in the activation of the microbicidal mechanisms NOX2 and iNOS, SCV-progression and inflammatory response by the expression of *il-6*, in a model of *in vitro* infection with *S. typhimurium* in mouse peritoneal macrophages.
4. Determination of whether SLAMF8 modulates the expression of *tlrs* and *Slamf9* in mouse peritoneal macrophages infected with *S. typhimurium in vitro*.
5. Analysis of SLAMF8 involvement in the activation of Src kinase and SHP-1 phosphatase, in the *in vitro* infection model with *S. typhimurium* in mouse peritoneal macrophages.
6. Confirmation of SLAMF8 function in mouse macrophages by analysing the effect of SLAMF8 overexpression in a murine macrophage cell line.
7. Analysis of SLAMF8 involvement in the ability to eliminate *S. typhimurium in vivo*.
8. Study the effect of SLAMF8 on NOX2 activation pathways in human macrophages through its overexpression and its expression in different macrophage subtypes.

OBJETIVOS

Conocida la función reguladora negativa de SLAMF8 sobre NOX2 a través de la PKC²¹⁸, y la probable implicación de p38 MAPK³⁴² en Mφ de ratón, y su posible participación en la respuesta inflamatoria²¹⁹, nos planteamos estudiar en profundidad el papel regulador de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 a través de vías directas e indirectas de la PKC, así como su impacto en la activación de Mφ sobre los mecanismos microbicidas en la progresión de infecciones graves. Finalmente, dada su función en Mφ de ratón, analizamos su posible papel en Mφ humanos.

Para llevar a cabo estos estudios nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar en profundidad la modulación de SLAMF8 sobre las vías de activación de NOX2 a través de PKC, p38 MAPK y PI3K, y el ensamblaje de este complejo en la membrana celular en macrófagos peritoneales de ratón.
2. Determinar el efecto de SLAMF8 en la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos peritoneales de ratón.
3. Estudiar la modulación de SLAMF8 sobre la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS, la progresión del SCV y la respuesta inflamatoria por la expresión de *il-6*, en un modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium* en macrófagos peritoneales de ratón.
4. Determinar si SLAMF8 modula la expresión de *tlrs* y *Slamf9* en macrófagos peritoneales de ratón infectados con *S. typhimurium in vitro*.
5. Analizarla implicación de SLAMF8 sobre la activación de la Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, con el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium* en macrófagos peritoneales de ratón.
6. Confirmar la función de SLAMF8 en macrófagos de ratón, mediante la sobreexpresión de SLAMF8 en una línea tumoral de macrófagos murinos.
7. Analizar la implicación de SLAMF8 en la capacidad de eliminación de *S. typhimurium in vivo*.
8. Estudiar el efecto de SLAMF8 sobre las vías de activación de NOX2 en Mφ humanos mediante su sobreexpresión, y su expresión en diferentes subtipos de macrófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones: desarrollo y mantenimiento

En este trabajo se utilizaron ratones macho que tenían entre 8 y 12 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos (SPF, *Specific Pathogens Free*) en el animalario del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Todas las metodologías en las que se han implicado animales de experimentación han sido aprobadas por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Granada. Referencias: CEEA-379 y CEEA-417-2012.

Los ratones salvajes (WT, *wild type* o SLAMF8^{+/+}) utilizados como control en los ensayos, eran ratones BALB/cAnNHsd consanguíneos provenientes de laboratorios Harlan®. Los ratones BALB/c deficientes en SLAMF8 (*knockout* o SLAMF8^{-/-}) fueron desarrollados por el Dr. A. Coyle y el Dr. J. C. Gutiérrez-Ramos (*Millennium Pharmaceuticals*, Cambridge, MA)²¹⁸ como se indica a continuación. El vector empleado en la correspondiente delección genética fue generado a partir de un clon pBAC129/Sv de ratón (RPC1-22) y clonado en el vector neo/tk/pBluescript. En dicho vector, la región extracelular y transmembrana correspondiente con los exones 2-4 del gen *Slamf8* fueron reemplazadas por el gen de resistencia a neomicina, MC1neo. Una vez linearizado el vector se insertó en células madre embrionarias (ES cells, *Embryonic Stem cells*) BALB/cJ (clon parental MKV39.7). A continuación, las células ES resistentes a geneticina (G-418) fueron seleccionadas por *Southern blot*, inyectadas en blastocitos BALB/c y los ratones con transmisión a línea germinal se cruzaron con ratones BALB/c hasta conseguir la generación homocigótica, obteniendo así un haplotipo BALB/c puro (Fig. 34). Los ratones SLAMF8^{-/-} fueron donados gentilmente por el Dr. Terhorst (*Division of Immunology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, United States*) al laboratorio de la Dra. Ana C. Abadía Molina.

2. Genotipado de ratones

Para comprobar el correcto genotipo de los ratones, se llevó a cabo un análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) del ADN genómico obtenido de las colas de los ratones empleados en la parte experimental.

2.1. Obtención de ADN genómico

Fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de colas de ratón fueron digeridos en 500 µl de una solución tamponada con 1 mg/ml de proteinasa K (TRIS-HCl 50 mM, pH 8 (Sigma Aldrich)), EDTA 0,1 M (Merck) y dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck) al 0,5% durante 16 h. a 55°C. A

continuación, se añadió 2,5 µl de RNAsa (Invitrogen™) a una concentración de 10 µg/ml y las muestras se incubaron durante 30 min. a 60°C. Posteriormente, se añadió 50 µl de acetato sódico 3M (pH 7) y 500 µl de fenol-cloroformo (Invitrogen™) a una proporción en volumen 1:1. Se mezcló por vórtex y se centrifugó a 17.000xg durante 5 min. a temperatura ambiente. La fase acuosa fue tomada, mezclada con 350 µl de isopropanol (Scharlau) y centrifugada a 17.000xg durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado obtenido, se lavó en 1 ml de etanol al 70% a 17.000xg durante 5 min. Después de la centrifugación, el precipitado nuevamente obtenido fue lavado con 1 ml de etanol absoluto (Scharlau) a 17.000xg durante 5 min. Finalmente, el precipitado que contenía el ADN genómico fue resuspendido en 50 µl de agua doble destilada durante 16 h. a 55°C. La concentración y pureza relativa del ADN genómico se midió en un nanodrop ND100 (Thermo Scientific™). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la amplificación de los fragmentos de interés por PCR convencional.

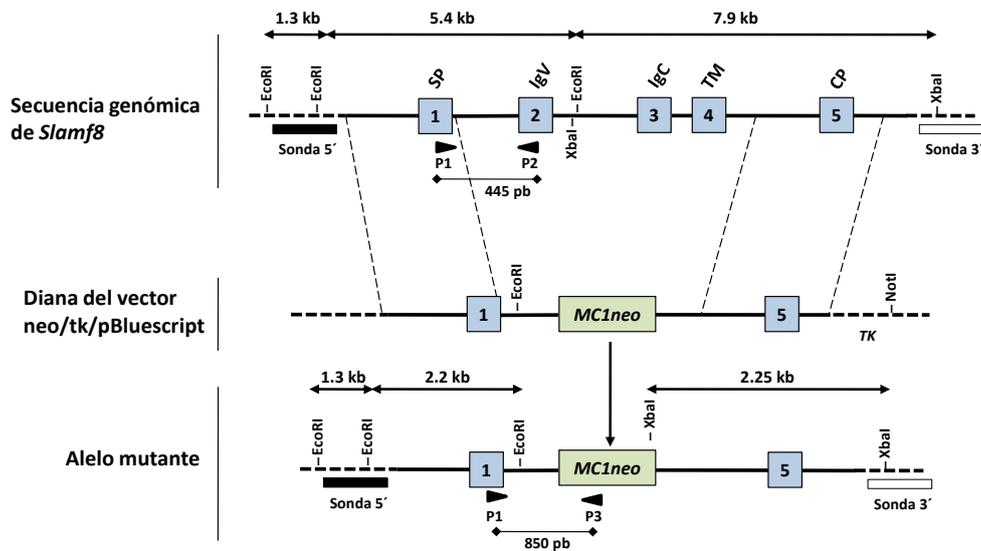


Figura 34. Sustitución de los exones 2-4 del gen *Slamf8* en ratones BALB/c *SLAMF8*^{+/+} 218. Para el desarrollo de ratones deficientes en *Slamf8*, las secuencias génicas desde el exón 2 al 4 del gen de *Slamf8* codificantes para las regiones extracelular y transmembrana de la proteína, fueron reemplazadas por el gen de resistencia a neomicina (*MC1neo*). En la figura se muestra la localización de los exones numerados del 1 al 5 y las regiones de la proteína que codifican: *SP*, péptido señal; *IgV*, dominio inmunoglobulina variable, *IgC*, dominio inmunoglobulina constante; *TM*, región transmembrana; *CP*, región citoplasmática. Además, se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción (*EcoRI*, *XbaI* y *NotI*), y el tamaño de los fragmentos generados para la detección de la recombinación homóloga, a través de *Southern blot*: el alelo endógeno *wild type* *Slamf8*, produce una banda de 5.4 kb y 1.3 kb, mientras que el alelo mutante genera una banda adicional de 2.2 kb, cuando la digestión se lleva a cabo con *EcoRI*. Para confirmar el sitio de integración se llevó a cabo una digestión con *XbaI*, la cual generaba un fragmento de 7.9 kb en el alelo endógeno *wild type* *Slamf8* y un fragmento de 2.25 kb en el mutante, cuando se empleaba una sonda en posición 3'. Por último, se indica la posición y orientación de los cebadores (P1, P2 y P3), así como el tamaño del fragmento generado en la amplificación del alelo *wild type* y mutante durante la PCR de ADN genómico. En el alelo *wild type*, P1 y P2 amplifican una secuencia de 445 pb comprendida entre los exones 1 y 2 mientras que, en el alelo mutante, P1 y P3 amplifican un fragmento de 850 pb comprendido entre el exón 1 y el gen de resistencia a neomicina, *MC1neo*.

2.2. PCR de ADN genómico y visualización de los fragmentos amplificados en gel de agarosa

Para la determinación del genotipo de los ratones se llevó a cabo una PCR convencional con 500 ng del ADN genómico obtenido. Se utilizaron tres cebadores denominados: P1, P2 y P3, cuyas secuencias se encuentran en la **tabla 10**. La combinación de P1 y P2 amplifican el alelo endógeno *Slamf8 wild type* (del exón 1 al 2) generando una banda de 445 pares de bases (pb) sólo en ratones *SLAMF8^{+/+}*, mientras que la combinación P1 y P3 amplifican el gen de resistencia a neomicina produciendo una banda de 850 pb, sólo en los ratones *SLAMF8^{-/-}*. Para la PCR se usó una dilución 1/10 en DMSO (Sigma Aldrich) al 20% de cada una de las muestras, las parejas de cebadores apropiadas y el reactivo *PCR Master Mix Kit* (Promega) según las instrucciones del fabricante, empleando un termociclador *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Las condiciones de amplificación consistieron en: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 4 min., seguido de 35 ciclos de amplificación a 95°C durante 45 seg., 50°C por 1 min., 72°C por 1 min. y 30 seg., y un paso final de extensión a 75°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (Lonza) al 1%, preparado en tampón TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) que contenía Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM (Panreac) y EDTA 1 mM. Los geles fueron teñidos con 0,6 µl de bromuro de etidio (Thermo Scientific™) a una concentración de 0,5 µg/ml y sometidos a migración electroforética en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad) durante 30 min. a voltaje constante de 100V en tampón TAE. La visualización de los geles se llevó a cabo en un revelador con luz ultravioleta (*Gel Printer Plus*) empleando un marcador de peso molecular estándar de 100 pb (*Bench Top 100 pb DNA ladder*, Promega) para el calibrado y detección de los fragmentos amplificados (**Fig. 35**).

Tabla 10. Cebadores usados en la PCR de ADN genómico.

Nombre	Descripción	Secuencia (5'→3')
P1	<i>Slamf8</i> DNA Exon1, Forward	GAAAGGAGGCTGACTTACAAGAAC
P2	<i>Slamf8</i> DNA Exon 2, Reverse	CTGGATACAGATGCCACTGGTAAC
P3	<i>Slamf8</i> DNA Cassete neo, Forward	AGGTAGCCGGATCAAGCGTAT

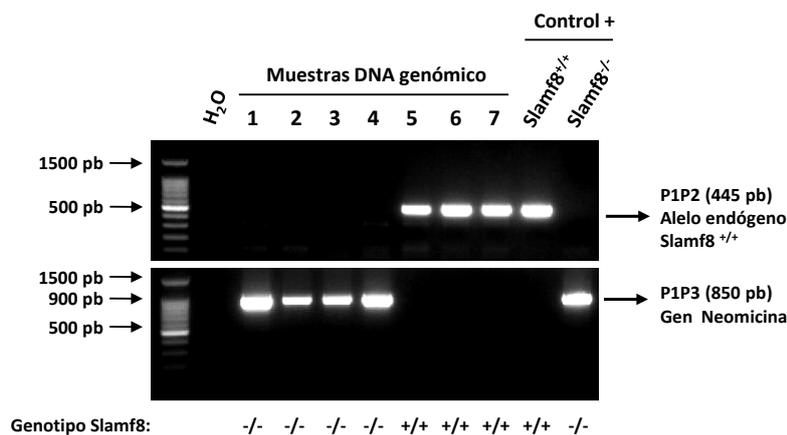


Figura 35. Análisis del genotipo de los ratones. El genotipo de los ratones empleados se analizó por medio de PCR de ADN genómico de cola de ratón. La imagen muestra un gel de agarosa representativo de 7 muestras de ADN genómico, donde los fragmentos amplificados fueron visualizados por tinción de bromuro de etidio y revelado con luz UV. Las muestras de ratones *SLAMF8*^{-/-} (1, 2, 3 y 4) amplificó un fragmento de 850 pb correspondiente al gen de resistencia a neomicina, mientras que las muestras de ratones *SLAMF8*^{+/+} (5, 6 y 7) amplificó un fragmento de 445 pb, correspondiente a la secuencia génica comprendida entre los exones 1 y 2 del gen *Slmf8*.

3. Células

3.1. Macrófagos peritoneales de ratón

En este apartado se explicará la metodología empleada para la obtención y asilamiento de macrófagos peritoneales de ratón (pMφ), así como la manera de comprobar su fenotipo y el mantenimiento en cultivo hasta la estimulación *in vitro*.

3.1.1. Aislamiento de los pMφ

Para la obtención de los pMφ se inyectaron intraperitonealmente (i. p.) 2 ml de una solución estéril de tioglicolato (TGC) (Difco™ *Fluid Thioglycollate Medium*, BD Biosciences) al 4% en agua destilada. Al cuarto día los ratones fueron sacrificados en atmosfera saturada de CO₂ y la población peritoneal fue aislada mediante lavado de la cavidad peritoneal con tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*) (GIBCO) frío.

3.1.2. Análisis del fenotipo de la población leucocitaria del peritoneo

Para comprobar que el fenotipo de la población peritoneal obtenida se correspondía principalmente con una población de Mφ CD11b⁺F4/80⁺, se llevaba a cabo un análisis rutinario por citometría de flujo de las poblaciones obtenidas de los lavados peritoneales. El procedimiento metodológico de esta técnica se encuentra detallado en el punto 9 del apartado materiales y métodos.

El análisis de marcado por citometría de flujo (**Fig. 36**), garantizaba que la población predominante obtenida del peritoneo de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} era principalmente M ϕ , ya que existía un predominio de células con fenotipo CD11b⁺F4/80⁺Ly6G⁻Ly6C^{+/+21}.

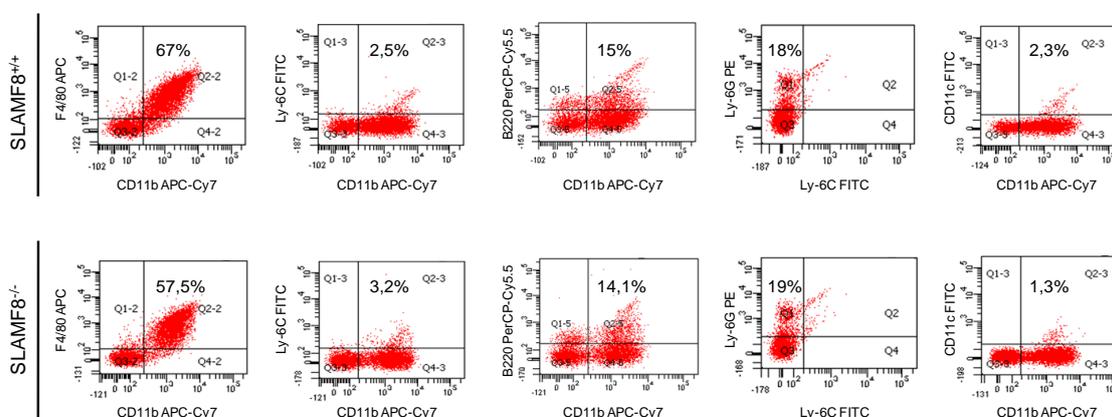


Figura 36. Análisis de la población peritoneal obtenida de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} tras la inyección i. p. con TGC, mediante citometría de flujo. Las imágenes muestran un análisis representativo del fenotipo de la población peritoneal. Para ambos tipos de ratones no se observan diferencias entre la detección de los marcadores fenotípicos usados, presentando las células obtenidas un predominio fenotípico característico de M ϕ .

3.1.3. Cultivo de los pM ϕ

Dependiendo del procedimiento experimental, los pM ϕ fueron sembrados en diferentes concentraciones y soporte de ensayo, pero mantenidas siempre en medio de cultivo *HyClone* RPMI 1640 (GE Healthcare) suplementado con 0,5% de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) descomplementado (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (PAA[®]), 5 mM de HEPES (Biowest) y 1 mM de piruvato sódico (Sigma Aldrich), en un incubador humidificado *HERA Cell 150i* (Thermo Scientific[™]) a 37°C y 5% de CO₂. Dos días después del cultivo, las células se lavaron con PBS a 37°C para eliminar células no adheridas, permitiendo así la selección de los pM ϕ , y se adicionó medio de cultivo previamente calentado a 37°C, hasta la activación con el correspondiente estímulo. La siguiente imagen (**Fig. 37**), muestra el aspecto morfológico de los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} antes de la activación.

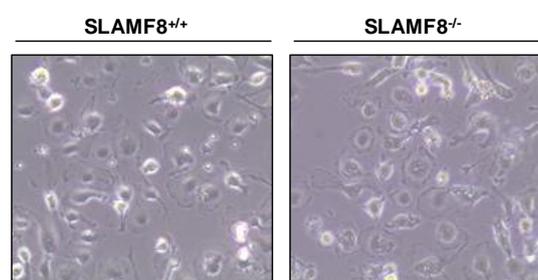


Figura 37. Morfología celular de los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. Los pM ϕ obtenidos son células adherentes y tienen una morfología típica de M ϕ . Presentan un aspecto principalmente redondeado con proyecciones de pseudópodos, no detectándose diferencias a nivel morfológico entre ambos tipos de pM ϕ . Magnificación original 20x.

3.2. RAW264.7

La línea celular RAW264.7 consiste en una línea tumoral de Mφ de ratón de la cepa BALB/c³⁴³. Estas células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 75 cm² (VWR™) usando el medio de cultivo DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (PAA®) y mantenidas en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂. Los cambios de medio se realizaron cada 3-4 días. En éstos primeramente las células adheridas se lavaron con PBS para eliminar las células muertas no adheridas, posibles restos celulares y FBS. A continuación, las células fueron tratadas con tripsina/EDTA (PAA®) durante 5 min. a 37°C. Posteriormente, la tripsina fue inhibida con medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 10% y las células fueron despegadas mecánicamente, tomadas y lavadas con PBS por centrifugación a 480xg durante 5 min. a 4°C. Por último, las células fueron resuspendidas en el apropiado medio de cultivo suplementado y sembradas en frascos de cultivo.

3.3. THP-1

La línea celular THP-1 se corresponde con una línea tumoral monocítica humana³⁴⁴. Estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm² usando el medio de cultivo *HyClone RPMI 1640* suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 5 mM de HEPES y 1 mM de piruvato sódico, en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂. Los cambios de medio se realizaron cada 2 días. Para ello, las células se tomaron del frasco de cultivo y se lavaron con PBS por centrifugación a 480xg durante 5 min. a 4°C. Finalmente, las células fueron resuspendidas en el apropiado medio de cultivo suplementado y sembradas en frascos de cultivo.

4. Transfecciones celulares para la sobreexpresión de SLAMF8

En este apartado se detallará la metodología empleada en la generación de las líneas celulares RAW264.7 y THP-1 con capacidad de sobreexpresión del SLAMF8 murino y humano, respectivamente. Además, se explicarán las técnicas empleadas en la comprobación del fenotipo de sobreexpresión.

4.1. Sobreexpresión de SLAMF8 murino en RAW264.7

El vector de sobreexpresión usado en la línea RAW264.7, fue un pCMV6 (Origen™) que contenía clonada la secuencia *full lenght* de SLAMF8 de ratón (MR203747, pCMV6-Slamf8). En la siguiente figura (**Fig. 38**), se muestra el mapa del vector, así como sus características. Presenta una etiqueta que consiste en una secuencia de ADN que codifica para una parte

proteica del c-Myc humano de 10 aminoácidos (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) seguida de la secuencia DDK de 8 aminoácidos (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys). Ambos fragmentos aminoacídicos se sitúan en la región C-terminal de la proteína traducida codificada por la secuencia *full lenght* y antes del codón de terminación de la traducción (UAA). Dichas secuencias son empleadas como epítomos para la detección antigénica de la proteína total traducida, mediante anticuerpos específicos para estas secuencias de aminoácidos.

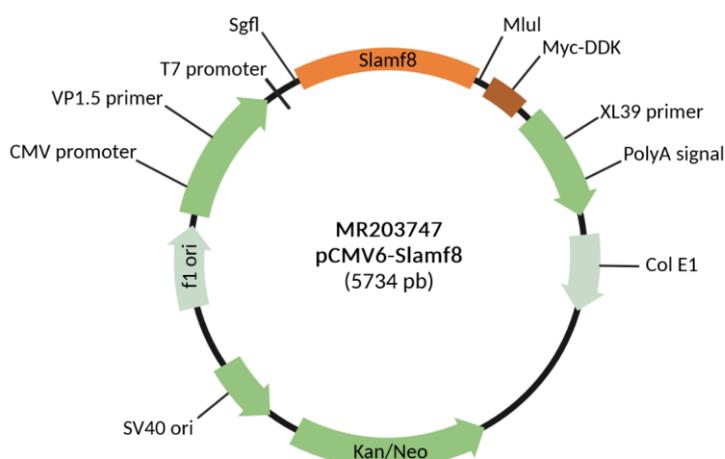


Figura 38. Mapa del vector de sobreexpresión MR203747 o pCMV6-Slamf8. El vector usado en los experimentos de sobreexpresión en RAW264.7 fue un pCMV6 que contenía clonada la secuencia *full lenght* de SLAMF8 de ratón (MR203747, Origene™). La imagen muestra las características del vector. La secuencia *Col E1*, actuaría como sitio de inicio de la replicación en bacterias, mientras que la secuencia *SV40*, permitiría la replicación en células de mamífero. Como promotor de la expresión de la proteína, se encuentra el promotor del Citomegalovirus, *CMV promoter*. En naranja el marco abierto de lectura (*ORF, Open Reading Frame*) que codifica para el SLAMF8 murino, el cual se encuentra entre los sitios de restricción para las enzimas *SgfI* y *MluI*. A continuación, se sitúa la etiqueta de detección *Myc-DDK* y finalmente la secuencia *PolyA*. *VP1.5* y *XL39*, son los cebadores que se pueden usar para la detección por PCR o secuenciación del *ORF*. La secuencia *Kan/Neo*, codifican para los genes de resistencia para kanamicina y neomicina (o geneticina, G-418), que permite la selección positiva en bacterias y células de mamífero respectivamente. La secuencia *f1 ori*, actuaría como señal de inicio de la replicación *in vitro* mientras que la secuencia *T7 promoter*, actuaría como promotor de la transcripción *in vitro*.

4.1.1. Determinación de la tolerancia a G-418 en RAW264.7

Con el fin de establecer la dosis mínima a utilizar del agente de selección en las células RAW264.7 transfectadas con el vector pCMV6-SLAMF8, se realizó una curva de muerte celular usando concentraciones crecientes de G-418 (GIBCO) en células sin transfectar. Para ello, se sembraron las células en placas de 24 pocillos (Nunc™) y fueron mantenidas en el apropiado medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de G-418 en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂. El medio selectivo fue reemplazado cada cuatro días y el porcentaje de muerte celular fue determinado por medio del conteo de las células muertas a través del método de exclusión por azul tripán. Dicho método consistió en

eliminar el medio de cultivo, y teñir las células con una solución de azul tripán al 0,4% durante 1 min., después lavar el pocillo con PBS tres veces y contar las células teñidas y totales empleando un microscopio óptico invertido *Axiovert 40 CFL* (Zeiss). El cálculo del porcentaje de muerte celular se determinó, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Muerte celular} = \left(\frac{\text{Número de células muertas}}{\text{Número de células totales}} \right) \times 100$$

La dosis de selección a usar fue la dosis mínima de G-418 que indujo más de un 90% de muerte celular en células no transfectadas, que en este caso fue de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 39).

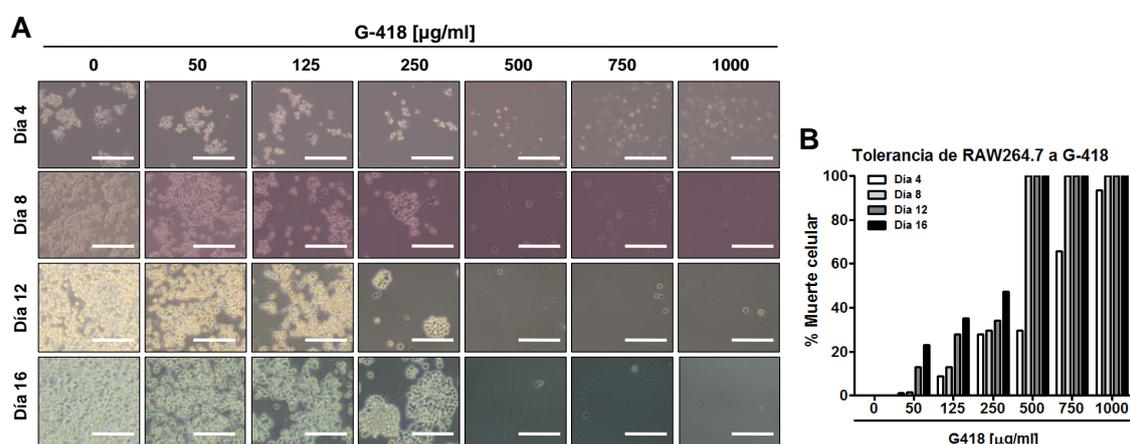


Figura 39. Determinación de la tolerancia a G-418 en la línea celular RAW264.7. (A) Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y mantenidas en cultivo con diferentes concentraciones del antibiótico G-418. El medio fue reemplazado cada 4 días y se visualizaron las células mediante microscopía óptica. Barra de escala: 200 μm . (B) Representación gráfica de la tolerancia de RAW264.7 a G-418, expresada como el porcentaje de células muertas, determinado por el método de exclusión por azul tripán.

4.1.2. Metodología de transfección en RAW264.7 y selección clonal

El SLAMF8 de ratón fue establemente transfectado en RAW264.7. Para ello, $1 \cdot 10^6$ células fueron electroporadas con 1 μg del vector usando un nucleofector (*NucleofectorTM Amaxa[®]*) con el programa D-032, según las recomendaciones del fabricante. Después, las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos (*NuncTM*) y mantenidas en el apropiado medio de cultivo suplementado con 500 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO_2 . Después de ocho días, las células vivas adheridas al pocillo fueron despegadas con tripsina, lavadas y contadas empleando una cámara de *Neubauer* (*Marientfeld[®]*). Luego, se

sembraron en placas de 96 pocillos (Nunc™) para generar una población monoclonal de sobreexpresión de SLAMF8, por medio de la técnica de dilución seriada³⁴⁵. Las células fueron mantenidas en el apropiado medio de cultivo de selección y los clones fueron detectados como colonias simples provenientes de una única célula al día siguiente del sembrado, por medio de un microscopio invertido *Axiovert 40 CFL*.

Una vez detectados los pocillos que contenían los clones, éstos fueron mantenidos en cultivo y pasados a placas de 24 pocillos primera y posteriormente a placas de 12 pocillos cuando alcanzaron una confluencia del 80-90%. A continuación, las poblaciones monoclonales resultantes de la transfección fueron analizadas mediante diferentes técnicas, para determinar la sobreexpresión de SLAMF8.

Como células control (*Mock-transfected cells*), se emplearon células sometidas al mismo proceso de transfección por electroporación sin el vector pCMV6-SLAMF8.

4.1.3. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7

La sobreexpresión estable de SLAMF8 en RAW264.7, fue comprobada por medio del análisis de expresión del ARNm por RT-PCR, *Western blot* y microscopía láser confocal (**Fig. 40**).

4.1.3.1. Análisis de expresión del ARNm por RT-PCR

El ARN total fue obtenido mediante el método de extracción fenólica³⁴⁶. Éste y el procedimiento de RT-PCR para el análisis del ARNm, se encuentran detallados en el punto 15 del apartado materiales y métodos.

Una mayor intensidad de banda correspondiente con el fragmento *full lenght* de SLAMF8 de ratón detectado en las células establemente transfectadas (**Fig. 40A**), fue indicativo de la sobreexpresión de SLAMF8 en esta línea celular.

4.1.3.2. Análisis de expresión por *Western blot*

Las células fueron lavadas con PBS frío tres veces y lisadas en el apropiado tampón de lisis durante 30 min. en hielo, para obtener un extracto de proteínas totales. El procedimiento para la obtención de los diferentes tipos de extractos, así como la metodología empleada en el desarrollo de la técnica de *Western blot*, se encuentra detallada en el punto 11 del apartado materiales y métodos.

La detección de la sobreexpresión se llevó a cabo usando un anticuerpo, anti-c-Myc (9E10), capaz de reconocer la etiqueta c-Myc que incorpora la proteína SLAMF8 en su extremo c-

terminal, por lo que se visualizó en el revelado una banda a 31.1 kDa que correspondía al peso de la proteína SLAMF8 más el de la etiqueta de detección (**Fig. 40B**).

4.1.3.3. Análisis de expresión por microscopía láser confocal

La sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7 también se detectó mediante microscopía láser confocal como un marcado positivo para el anticuerpo anti-c-Myc (9E10), en las células establemente transfectadas (**Fig. 40C**). La metodología empleada para el desarrollo de esta técnica se encuentra explicada en el punto 14 del apartado materiales y métodos.

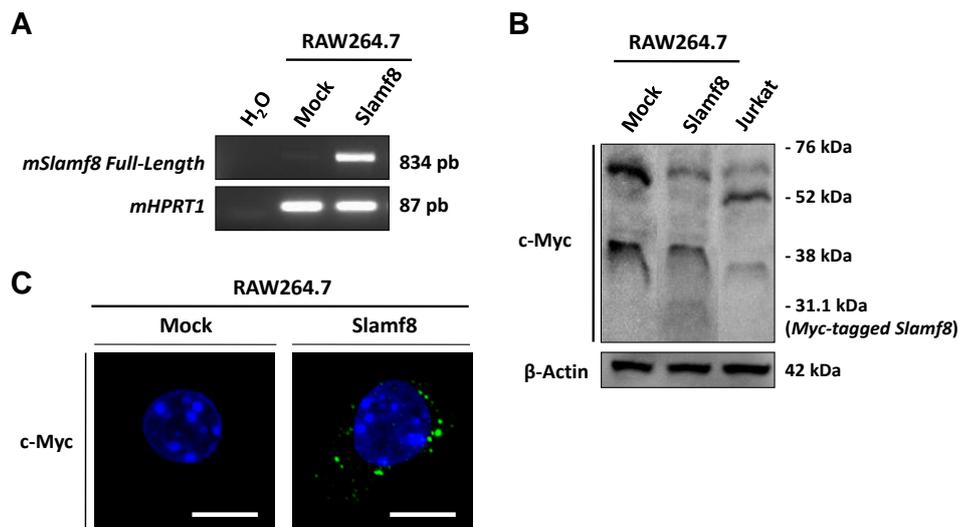


Figura 40. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 de ratón en RAW264.7. (A) Detección de la sobreexpresión del ARNm de *Slamf8* por medio de PCR convencional. Los fragmentos amplificados fueron visualizados por tinción de bromuro de etidio y revelado con luz UV. La expresión constitutiva del ARNm de *HPRT1* fue usada como control de carga. **(B)** Detección de la sobreexpresión de SLAMF8-Myc, mediante *Western blot*, con el anticuerpo anti-c-Myc (9E10). Como control positivo de c-Myc (banda aproximada a 67 kDa), se usaron extractos proteicos totales de la línea celular Jurkat. La β-actina fue usada como control de carga. **(C)** Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8-Myc, mediante microscopía láser confocal. Las células fueron marcadas con el anticuerpo anti-c-Myc (9E10) (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las imágenes muestran la proyección máxima de las series Z de las células fotografiadas mediante microscopía láser confocal. Barra de escala: 10 μm.

Detectado el clon con la mayor sobreexpresión de SLAMF8 (clon D-12), éste fue expandido y cultivado manteniendo la presión selectiva con G-418 en frascos de cultivo celular de 75 cm².

Un día antes de los procedimientos experimentales las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (Nunc™) a una proporción de 1·10⁶ células por pocillo, en medio de cultivo DMEM suplementado con 0,5% de FBS y mantenidas en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂ hasta su activación.

4.2. Sobreexpresión de SLAMF8 humano en THP-1

El vector de sobreexpresión usado en la línea THP-1, fue un pcDNATM4/myc-His (InvitrogenTM) que contenía clonada la secuencia *full lenght* de SLAMF8 de humano (hBL-FL-pcDNA4 myc-his). En la siguiente figura (Fig. 41), se muestra el mapa del vector, así como sus características.

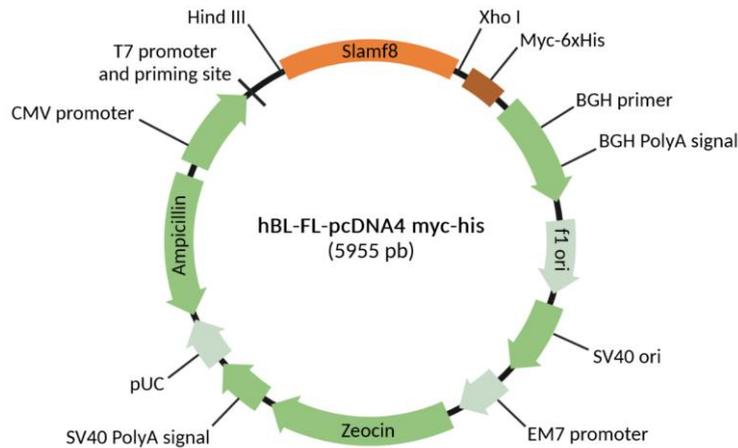


Figura 41. Mapa del vector de sobreexpresión hBL-FL-pcDNA4 myc-his. El vector usado en los experimentos de sobreexpresión en THP-1 fue un pcDNA4 myc-his que contenía clonada la secuencia *full lenght* de SLAMF8 humano. La imagen muestra las características del vector. La secuencia *pUC*, actuaría como sitio de inicio de la replicación en bacterias, mientras que la secuencia *SV40*, permitiría la replicación en células de mamífero. Como promotor de la expresión de la proteína, se encuentra el promotor del Citomegalovirus, *CMV promoter*. En naranja el *ORF* que codifica para el SLAMF8 humano, el cual se encuentra entre los sitios de restricción para las enzimas *Hind III* y *Xho I*. A continuación, se sitúa la etiqueta de detección *Myc-6xHis* y finalmente la secuencia PolyA de la hormona de crecimiento bovina (*BGH, Bovine Growth Hormone*). *T7 (priming site)* y *BGH (primer)*, son los cebadores que se pueden usar para la detección por PCR o secuenciación del *ORF*. Las secuencias *Ampicillin* y *Zeocin*, codifican para los genes de resistencia de ampicilina y zeocina, que permiten la selección positiva de bacterias y células de mamífero respectivamente. *EM7 promoter* actuaría como promotor de la expresión de zeocina en bacterias y la secuencia *SV40 PolyA* permitiría la terminación de la transcripción y poliadenilación de su ARNm. La secuencia *f1 ori*, actuaría como señal de inicio de la replicación *in vitro* mientras que la secuencia *T7 promoter*, actuaría como promotor de la transcripción *in vitro*.

4.2.1. Determinación de la tolerancia a ZeocinaTM en THP-1

Para establecer la dosis mínima a emplear del agente de selección en las células THP-1 transfectadas con el vector hBL-FL-pcDNA4 myc-his, también se realizó una curva de muerte celular en células sin transfectar empleando en este caso, concentraciones crecientes de zeocinaTM (InvivoGen). El procedimiento empleado en la determinación del porcentaje de muerte celular se realizó mediante el método de conteo basado en la exclusión por azul tripán comentado anteriormente.

La dosis de selección a usar fue la dosis mínima de zeocina™ que indujo más de un 90% de muerte celular en células no transfectadas, en este caso de 50 µg/ml (Fig. 42).

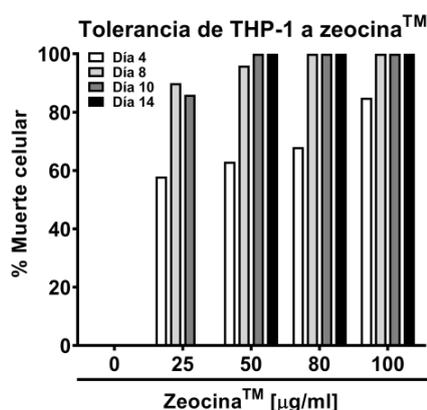


Figura 42. Determinación de la tolerancia a zeocina™ en la línea celular THP-1. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y mantenidas en cultivo con diferentes concentraciones del antibiótico zeocina™. El medio fue reemplazado cada 4 días. La figura muestra una representación gráfica de la tolerancia de THP-1 a zeocina™, expresada como el porcentaje de células muertas, determinado por el método de exclusión por azul tripán.

4.2.2. Metodología de transfección en THP-1 y selección clonal

El SLAMF8 humano fue transitoriamente transfectado en THP-1. Para ello, $1 \cdot 10^6$ células fueron electroporadas con 1 µg del vector usando un nucleofector (*Nucleofector™ Amaxa®*) con el programa V-001, según las recomendaciones del fabricante. Como células control se emplearon células transfectadas con el vector vacío empleando la misma metodología (*Mock-construct*). Una vez ejecutado el programa las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una proporción de $1 \cdot 10^6$ células por pocillo y mantenidas en el apropiado medio de cultivo suplementado con 50 µg/ml del agente de selección zeocina™ en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂.

4.2.3. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en THP-1 mediante citometría de flujo

La sobreexpresión de SLAMF8 en THP-1 fue analizada a diferentes tiempos después del procedimiento de nucleofección, mediante citometría de flujo (Fig. 43). El procedimiento metodológico de esta técnica se encuentra detallado en el punto 9 del apartado materiales y métodos.

La mayor expresión de SLAMF8 detectada después de la transfección con el vector hBL-FL-pcDNA4 myc-his en THP-1 fue a las 48 h. (Fig. 43), por lo que se estableció este tiempo como el momento idóneo para la realización de los experimentos de activación.

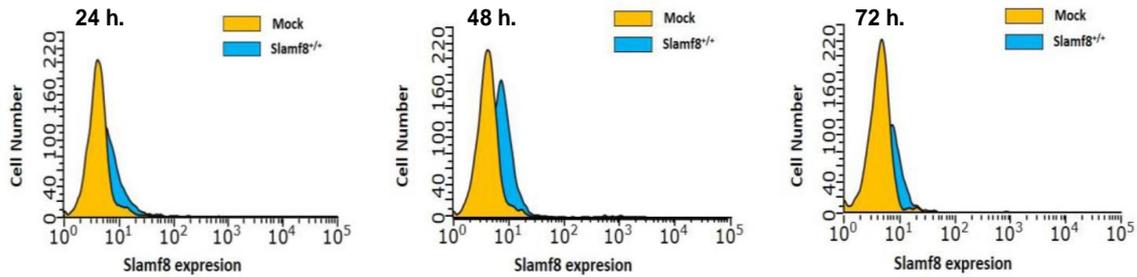


Figura 43. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 humano en THP-1 mediante citometría de flujo. Imágenes representativas de histogramas de citometría de flujo empleados para el análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 a diferentes tiempos después de la nucleofección con el vector hBL-FL-pcDNA4 myc-his en THP-1.

Antes de llevar a cabo la activación, las células se lavaron con PBS a 37°C, y se les adicionó medio de cultivo previamente calentado a 37°C, hasta la activación con el correspondiente estímulo.

5. Modelo de diferenciación *in vitro* de THP-1 a los subtipos de macrófagos M1 y M2

En este apartado se detallará la metodología empleada en el modelo de diferenciación *in vitro* de la línea celular THP-1 a los subtipos de Mφ M1 y M2³⁴⁷, destinados al estudio de la expresión de SLAMF8 mediante citometría de flujo y RT-PCR.

Para ello, se sembraron 1·10⁶ células en placas de 6,7 cm² de superficie (Nunc™) y fueron tratadas primeramente con 10 ng/ml de PMA durante 24 h. para inducir la diferenciación al subtipo M0 o neutral. Posteriormente el medio es retirado, las células son lavadas con PBS y tratadas durante 48 h. con 20 ng/ml de IFNγ humano y 100 ng/ml de LPS puro para la polarización hacia M1, o con 20 ng/ml de IL-4 humana para hacerlo hacia el subtipo M2.

Los fenotipos de los diferentes subtipos de Mφ fueron evaluados a nivel microscópico mediante un microscopio invertido *Axiovert 40 CFL* y por medio del análisis de expresión de marcadores mediante *Western blot* y RT-PCR. Confirmado el fenotipo de diferenciación, la expresión de SLAMF8 se evaluó mediante citometría de flujo y RT-PCR. Todos estos procedimientos metodológicos se encuentran detallados en sus correspondientes puntos del apartado materiales y métodos.

6. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas en los procedimientos experimentales fueron tres: una cepa salvaje de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028/NCTC 12023), misma cepa capaz de expresar la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) denominada *S. typhimurium*-GFP y una cepa atenuada, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SseB⁻ (*Salmonella typhimurium* SseB⁻, MvP643, p3232). Ambas cepas de bacteria fueron cedidas amablemente por el Prof. Dr. Michael Hensel (*University of Osnabrück, Germany*). La cepa salvaje de *S. typhimurium* fue crecida en medio Luria-BertniBroth (LB) (Invitrogen™), mientras que la cepa *S. typhimurium*-GFP y la cepa atenuada se crecieron en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich).

Todas las cepas fueron crecidas en un agitador orbital *Comecta* (I.C.T.) a 225 rpm y 37°C durante la noche bajo condiciones estériles. Al día siguiente, se determinó la concentración de bacteria en función de su densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda (λ) de 600 nm en un espectrofotómetro (*Spectronic® Genesys™ 8, Spectronic Instrument*), empleando la relación: 0,1 D.O./(10^8 bacterias/ml).

7. Reactivos de pretratamiento y activación celular

A continuación, se muestra en la **tabla 11** los diferentes reactivos usados en los procedimientos experimentales *in vitro*, bien como reactivos de pretratamiento o como agentes de activación.

Tabla 11. Reactivos de pretratamiento y activación celular.

Nombre	Casa Comercial	Concentración de trabajo
PMA	Sigma Aldrich	100 ng/ml (activación)
		10 ng/ml (diferenciación <i>in vitro</i> de THP-1)
LPS pure from E. coli O111:B4 (L3024)	Sigma Aldrich	10 µg/ml (activación)
		100 ng/ml (diferenciación <i>in vitro</i> de THP-1)
Bis-Indolyl-Maleimide I	Calbiochem	5 µM
SB203580	Calbiochem	10 µM
LY294992	Calbiochem	10 µM
Recombinant mouse IFNγ	GIBCO	100 U/ml
Recombinant human IFNγ	Life Technologies	20 ng/ml
Recombinant human IL-4	Life Technologies	20 ng/ml

En los experimentos de inhibición de las quinasas, los pMφ fueron pretratados con 5 μM de Bis-Indolyl-Maleimida I, 10 μM de SB203580 o 10 μM de LY294002 durante 1 h. antes de la activación con PMA, LPS puro o someterlos al modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium* comentado en el siguiente apartado.

8. Modelo de infección *in vitro* de macrófagos con *S. typhimurium*

Los pMφ fueron lavados con PBS a 37°C y se incubaron con IFNγ de ratón a 100 U/ml durante 16 h. Posteriormente las células fueron pre-tratadas o no durante 1 h. con los distintos inhibidores. Tanto los pMφ como las RAW264.7 que sobreexpresaban SLAMF8 (y *Mock*), fueron infectados a un índice de multiplicidad de infección (m.o.i.) de 10 con la cepa salvaje *S. typhimurium* durante un tiempo de pulso de 15 min. Después, las células fueron lavadas tres veces con medio suplementado con 10 μg/ml de gentamicina (Sigma Aldrich) durante 3 min. en un agitador orbital *Rotamax 120* (Heidolph) a 200 rpm. A continuación, las células fueron incubadas durante el tiempo de post-infección correspondiente, en medio suplementado con 10 μg/ml de gentamicina para eliminar la bacteria extracelular no fagocitada. Finalizado el tiempo de post-infección, las células fueron lavadas con PBS frío tres veces y sometidas a diferentes procedimientos, dependiendo de la técnica de análisis empleada con posterioridad.

9. Citometría de flujo

La citometría de flujo fue empleada para el análisis fenotípico de las poblaciones leucocitarias del peritoneo, análisis de sobreexpresión de SLAMF8 en THP-1 y finalmente, para el análisis de expresión de SLAMF8 en los subtipos de Mφ diferenciados de THP-1 *in vitro*.

- **Análisis fenotípico de las poblaciones leucocitarias del peritoneo**, se usaron anticuerpos monoclonales de los marcadores de superficie más característicos de éstas (los anticuerpos aquí empleados como los utilizados en otras técnicas experimentales, se detallan en la **tabla 12** localizada en el punto 10 del apartado materiales y métodos). La combinación de marcadores permitía distinguir las poblaciones en: Mφ (CD11b⁺F4/80⁺Ly6G⁻Ly6C^{-/+}), monocitos (CD11b⁺Ly6C⁺F4/80⁻), neutrófilos (CD11b⁺CD11a⁺Ly6G⁺F4/80⁻), DC (CD11b^{+/-}CD11c⁺Ly6C⁺F4/80⁻), células B (B220) y linfocitos (CD2⁺CD3⁺). Una vez obtenidas las células de la cavidad peritoneal, fueron lavadas con PBS a 450xg durante 5 min. y ajustadas a una concentración de 10⁶ células/ml antes de proceder a su tinción. En primer lugar, se realizó un bloqueo de los receptores para las fracciones constantes de las inmunoglobulinas G, empleando *Mouse BD FcBlock™* (BD Biosciences) a una dilución 1/200 durante 15 min. en hielo. Una vez finalizado el

bloqueo, las células se lavaron en PBS a 480xg durante 5 min. y fueron teñidas con la batería de anticuerpos conjugados con los distintos fluorocromos durante 30 min. en hielo y oscuridad. Después, las células fueron lavadas nuevamente en PBS y la intensidad de fluorescencia fue detectada y analizada usando un citómetro de flujo *FACSCanto II Flow Cytometer* (BD Biosciences).

- **THP-1**, las células se tomaron, lavaron con PBS a 450xg durante 5 min. y se trataron con *Blocking Reagent (human monocytes)* (Invitrogen™) a una dilución 1/100 durante 30 min. en hielo, para bloquear los receptores de las fracciones constantes de las inmunoglobulinas G. Seguidamente las células se lavaron nuevamente en PBS a 480xg durante 5 min.

A continuación, para determinar **la sobreexpresión de SLAMF8 en esta línea celular transfectada**, las células se incubaron con el anticuerpo biotilado *anti-human BLAME/SLAMF8* (BAF1907) a una dilución 1/40 durante 30 min. en hielo. Después, las células fueron lavadas en PBS e incubadas con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE, *Phyco Erythrin*) a una dilución 1/400 durante 30 min. en hielo y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas en PBS y analizadas en un citómetro de flujo *guava easy Cyte flow cytometer* (Millipore™).

En **la expresión de SLAMF8 en los subtipos de Mφ diferenciados de THP-1 in vitro**, las células fueron incubadas con el anticuerpo *anti-human BLAME/SLAMF8 PE* (250014) a una dilución 1/50 durante 30 min. en hielo y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente en PBS y analizadas en un citómetro de flujo *FACSCanto II Flow Cytometer*.

10. Anticuerpos

A continuación, se detalla en la **tabla 12** los anticuerpos usados en los diferentes procedimientos metodológicos de esta tesis doctoral.

Tabla 12. Anticuerpos usados en los procedimientos metodológicos.

Nombre	Casa Comercial	Técnica*	Dilución de trabajo
<i>Anti-mouse CD2 PE (RM2-5)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse CD3e FITC (145-2C11)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse CD11a FITC (M17/4)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse/human CD11b APC-Cy7 (M1/70)</i>	Biolegend	CMF	1/25
<i>Anti-mouse CD11c FITC (N418)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse Ly-6G Gr1 PE (RB6-8C5)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse/human CD45R (B220) PerCP-Cy5.5 (RA3-6B2)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Anti-mouse F4/80 APC (BM8)</i>	Biolegend	CMF	1/25
<i>Anti-mouse Ly-6C FITC (AL-21)</i>	BD Biosciences	CMF	1/25
<i>Anti-human BLAME/SLAMF8 Biotinylated (BAF1907)</i>	R&D Systems	CMF	1/40
<i>Anti-human BLAME/SLAMF8 PE (250014)</i>	R&D Systems	CMF	1/50
<i>Streptavidin PE Conjugate</i>	eBioscience	CMF	1/400
<i>Rat IgG2b Isotype Control FITC (eB149/10H5)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Rat IgG2a Isotype Control PE (KLH/G2a-1-1)</i>	Southern Biotech	CMF	1/25
<i>Rat IgG2a Isotype Control PerCP-Cy5.5 (eBR2A)</i>	eBioscience	CMF	1/25
<i>Rat IgG2a Isotype Control APC (RTK4530)</i>	Biolegend	CMF	1/25
<i>Rat IgG2b Isotype Control APC/Cy7 (RTK4530)</i>	Biolegend	CMF	1/25
<i>Phospho-(Ser) PKC Substrate</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>Phospho-p40^{phox} Thr 154</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>Phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (3D7)</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>Phospho-ERK (E-4)</i>	Santa Cruz	WB	1/1000
<i>Phospho-SHP-1 Tyr564 (D11G5)</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>Phospho-Src Family Tyr416 (D49G4)</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>p38α/β MAPK (H-147)</i>	Santa Cruz	WB	1/1000
<i>Rac1/2/3</i>	Cell Signaling	WB	1/1000
<i>Calnexin (H-70)</i>	Santa Cruz	WB	1/750
<i>iNOS/NOS Type II (54/iNOS)</i>	BD Biosciences	WB	1/1000
<i>E-cadherin (Sec11)</i>	Santa Cruz	WB	1/1000
<i>β-Actin (AC-15)</i>	Sigma Aldrich	WB	1/10000
<i>ECLTM anti-mouse IgG HRP</i>	GE Healthcare	WB	1/5000
<i>ECLTM anti-rabbit IgG HRP</i>	GE Healthcare	WB	1/5000
<i>p47^{phox} (H-195)</i>	Santa Cruz	WB, MLCF	1/1000, 1/100
<i>c-Myc (9E10)</i>	Santa Cruz	WB, MLCF	1/750, 1/100
<i>Rab5 (D-11)</i>	Santa Cruz	MLCF	1/100
<i>Rab7 (H-50)</i>	Santa Cruz	MLCF	1/100
<i>Alexa Fluor[®]488 goat anti-mouse IgG</i>	Invitrogen TM	MLCF	1/1000
<i>Alexa Fluor[®]594 goat anti-rabbit IgG</i>	Invitrogen TM	MLCF	1/1000
<i>Alexa Fluor[®]647 donkey anti-mouse IgG</i>	Invitrogen TM	MLCF	1/1000

*CMF: Citometría de Flujo; WB: Western blot y MLCF: Microscopia Láser Confocal.

11. Western blot

En este apartado se explicará la metodología empleada para la obtención de los extractos totales, citosólicos y de membrana. Además, se detallará la manera en la que se realizaron los *Western blots* de los diferentes extractos proteicos obtenidos.

11.1. Obtención de extractos totales

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una proporción de $1 \cdot 10^6$ células por pocillo y se mantuvieron en cultivo como se comentó con anterioridad, hasta la activación con el correspondiente estímulo. Una vez finalizadas las activaciones, se llevó a cabo tres lavados con PBS frío. A continuación, las células fueron lisadas en 50 μ l de tampón de lisis que contenía Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM, NaCl 140 mM (Scharlau), EDTA 2 mM, NP40 1% (Fluka), iodoacetamida 10 mM (Sigma Aldrich), pirofosfato de sodio 5 mM (Sigma Aldrich), ortovanadato de sodio 1 mM (Sigma Aldrich), óxido de fenilarsina 50 μ M (Sigma Aldrich), fluoruro de sodio 50 mM (Sigma Aldrich), fluoruro de fenilmetilsufonilo 1 mM (Sigma Aldrich), cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa al 1X (Roche), durante 30 min. en hielo. Después, los extractos celulares fueron recogidos con un raspador (*Biologix cells crapper*) y centrifugados a 17.000xg durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación contenía el extracto total de proteínas. Posteriormente se calculó la concentración de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford³⁴⁸ (Bio-Rad) en placas de 96 pocillos. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector cinético de microplacas *Multiskan EX* (Thermo Scientific™) a una λ de 590 nm. En cada lectura se usó albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich) para elaborar una curva estándar y el cálculo de la concentración proteica de las muestras fue determinado mediante una regresión lineal. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

11.2. Obtención de extractos citosólicos y de membrana

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 6,7 cm² de superficie a una proporción de $5 \cdot 10^6$ células por placa y se mantuvieron en cultivo como se indicó anteriormente, hasta su activación con PMA 100 ng/ml a diferentes tiempos. Finalizadas las activaciones, las células se lavaron tres veces con PBS frío y fueron lisadas en tampón de lisis que contenía HEPES (pH 7.3) 100 mM (Sigma Aldrich), KCl 100 mM (Panreac), NaCl 3 mM, MgCl₂ 3 mM (Sigma Aldrich), EGTA 1,25 (Merck), fluoruro de fenilmetilsufonilo 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa al 1X, durante 30 min. a 4°C. A continuación, los extractos celulares fueron recogidos con un raspador y sonicados en hielo (*Ultraschall processor*

UP200H, Dr. Hielscher, Teltow, *Germany*) tres veces durante 5 seg. a 60 amperios, separados por intervalos de 30 seg. Después, los extractos fueron centrifugados a 10.000xg durante 5 min. a 4°C y la concentración de proteína del sobrenadante obtenido fue cuantificada mediante el método colorimétrico de Bradford indicado con anterioridad.

Una parte representativa del extracto total fue almacenada a -20°C hasta su uso. Para obtener la fracción de proteínas de membrana, 100 µg de proteína de cada muestra fueron llevadas a un volumen de 250 µl con el tampón de lisis anteriormente descrito y sometidas a ultracentrifugación a 100.000xg durante 30 min. a 4°C, en una ultracentrífuga *Optima™ MAX-E* (Beckman Coulter) y un rotor *TLA-110* de ángulo fijo. El sobrenadante obtenido constituía la fracción de proteínas citosólicas. El precipitado fue resuspendido en 35 µl de tampón de lisis que contenía NaH₂PO₄ (pH 7.4) 120 mM (Merck), MgCl₂ 1mM, EGTA 1 mM, ditiotreitolo 1 mM (Sigma Aldrich), glicerol al 20% (Sigma Aldrich), octilglucósido 40 mM (Sigma Aldrich), cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas al 1X, y sometido a ultracentrifugación a 20.000xg durante 40 min. a 4°C. El nuevo sobrenadante constituía la fracción de proteínas de membrana, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

11.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

De manera rutinaria se tomaron 25 µg de proteína de los extractos totales, mientras que para los extractos citosólicos y de membrana se usaron 30 µl del sobrenadante obtenido. Las muestras de los extractos fueron mezcladas con tampón de carga que contenía Tris-HCl 375 mM, β-mercaptoetanol al 30%, glicerol al 5% y azul de bromofenol al 0,1% (todos de Sigma Aldrich). Posteriormente fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 min., cargadas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (*Criterion™ Tris-HCl Precast Gels*, Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo durante 90 min. a voltaje constante de 110V, en un tampón de migración electroforética que contenía Tris-HCl 25 mM, SDS al 0,1% (SERVA) y glicina 192 mM (Sigma Aldrich), empleando una cubeta de electroforesis (Bio-Rad). Se usó un marcador de peso molecular en kDa (*Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full range*, GE Healthcare) para el seguimiento de la migración proteica a través del gel de poliacrilamida.

11.4. Transferencia húmeda a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Una vez finalizada la electroforesis de los geles de poliacrilamida, se llevó a cabo la transferencia proteica a membranas de PVDF (Bio-Rad). Para ello se empleó un tampón de transferencia electroforética que contenía Tris-HCl 20 mM, glicina 60 mM y metanol al 20%. La

transferencia húmeda se llevó a cabo usando una cubeta de electroforesis (Bio-Rad), durante 90 min. a voltaje constante de 110V.

11.5. Immunoblotting y revelado de proteínas

Finalizada la transferencia húmeda, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h., en agitación y temperatura ambiente con una solución de bloqueo de leche desnatada y BSA al 10% en tampón TTBS (*Tris-Tween-Buffered-Saline*) que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%. A continuación, las membranas fueron lavadas en TTBS durante 5 min. en agitación y expuestas a los diferentes anticuerpos empleados, durante toda la noche en agitación y a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas en TTBS durante 5 min. en agitación e incubadas durante 1 h. con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*ECLTM anti-rabbit/mouse IgG HRP*, GE Healthcare). Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente en TTBS durante 5 min. en agitación.

La detección y visualización de las bandas proteicas, se realizó por medio de quimioluminiscencia (QL)³⁴⁹ usando el reactivo *AmershamTM ECLTM Prime Western blotting detection Reagent* (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron tomadas por un sistema de captación de QL, *LAS-4000 mini* (Fujifilm). La QL de las bandas proteicas fueron cuantificadas mediante densitometría usando el *software Multi-Gauge* (V3.0, Fujifilm) y la expresión relativa fue normalizada al correspondiente control de carga empleado por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa normalizada} = \frac{\text{QL relativa de la proteína problema}}{\text{QL relativa de la proteína control de carga}}$$

12. Medida de la producción de anión superóxido

Los pMφ fueron sembrados en placas de 96 pocillos de color negro con fondo óptico y base de polímeros (NuncTM Micro WellTM) a una proporción de $1.5 \cdot 10^5$ células por pocillo. A los dos días se llevó a cabo un lavado con PBS a 37°C. A continuación, las células fueron pre-tratadas o no, con los inhibidores Bis-Indolyl-Maleimida I, SB203580, LY294992 y el reactivo luminiscente lucigenina (Santa Cruz) a una concentración de 150 μM en tampón *Hepes-Krebs-Ringer* (KR-Hepes), que contenía NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, H₂PO₄ 1,18 mM (Merck), MgSO₄ 1,18 mM (Merck), CaCl₂ 1,25 mM (Merk), glucosa 10 mM (Merk) y HEPES (pH 7.4) 25 mM. Después, se

midió la luminiscencia a tiempo cero (t_0) en un lector de placas Synergy™ Neo2 (Biotek®) y fueron incubados durante 1 h. en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂.

Finalizada la incubación, las células fueron activadas con PMA 100 ng/ml y la emisión de luminiscencia fue tomada a lo largo del tiempo a 37°C usando el *software* BioTek Gen5™.

La producción de anión superóxido (actividad NOX2) se calculó como el incremento de luminiscencia obtenido a cada tiempo (t_x), sobre el valor medido a t_0 empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad NOX2} = \left[\left(\frac{\text{Luminiscencia a } t_x}{\text{Luminiscencia a } t_0} \right) \times 100 \right] - 100$$

13. Medida de la producción de NO

La producción NO fue determinada por la medición de la concentración de NO₂⁻ en los sobrenadantes de los medio de cultivo, empleando la reacción de Griess³⁵⁰.

Finalizadas las activaciones, los sobrenadantes fueron tomados y centrifugados a 17.000xg durante 5 min. a 4°C para eliminar los posibles restos celulares. A continuación, se incubaron en placas de 96 pocillos con el reactivo de Griess que consistía en sulfanilamida al 1% (Sigma Aldrich) y naftil-etilendiamina diclorhidrato al 0,1% (MERK) en ácido fosfórico al 2,5% (Sigma Aldrich), durante 30 min. a temperatura ambiente y oscuridad. En cada lectura se usó una solución de nitrato sódico (NaNO₃) (Merck) para elaborar una curva estándar y el cálculo de la concentración del óxido nítrico (NO) fue determinada mediante una regresión lineal. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas Synergy™ Neo2 (Biotek®) a una λ de 540 nm.

14. Microscopía láser confocal

La técnica de microscopía laser confocal fue empleada para diferentes análisis. En todos ellos las células fueron sembradas a una proporción de $1,5 \cdot 10^5$ células por pocillo en portaobjetos *Lab-Tek™ II Chamber Slide™ Nunc™* y mantenidas en cultivo con su correspondiente medio en un incubador humidificado *HERA Cell 150i*, a 37°C y 5% de CO₂. A partir de este momento, el procedimiento metodológico difiere en función del análisis, por lo que se detallará cada uno de ellos en los siguientes puntos.

14.1. Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7

Las células se lavaron tres veces con PBS frío y fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min. en hielo. Después de la fijación, las células fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% (Sigma Aldrich) e incubadas durante 30 min. a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía suero de cabra al 2% (Sigma Aldrich) y *Mouse BD FcBlock™* a una dilución 1/200, en PBS-Tween-20 al 0,1%. Luego las células fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas con el anticuerpo primario anti-c-Myc (9E10) en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. Después de 2 h. de incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 1 h. en condiciones de oscuridad con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG* en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. Una vez finalizados los tiempos de incubación con los anticuerpos secundarios, las células fueron lavadas dos veces con PBS-Tween-20 al 0,1% y una última vez con PBS.

14.2. Análisis de la polimerización de actina en pMφ. Tinción de F-actina por faloidina-Tetrametilrodamina-Isotiocianato (TRITC)

Los pMφ se lavaron con PBS a 37°C y se adicionó medio fresco previamente calentado a 37°C hasta la activación. Después de la activación con PMA 100 ng/ml a diferentes tiempos, las células fueron lavadas con PBS frío, fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 min. con la solución *BD Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) durante 20 min. en hielo. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS-Saponina al 0,05% (Merck) y se procedió a la tinción con 5 µg/ml de falodina-TRIC (Sigma Aldrich) disuelta en PBS-Saponina al 0,05% durante 40 min. en hielo y oscuridad. Después, las células fueron lavadas dos veces con PBS-Saponina al 0,02% y una última vez con PBS.

14.3. Análisis de la colocalización de Rab5, Rab7 y p47^{phox} con *S. typhimurium*-GFP en pMφ

Los pMφ se lavaron con PBS a 37°C y se incubaron con IFNγ de ratón a 100 U/ml durante 16 h. A continuación, se realizó el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium* y finalizado éste, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min. en hielo y lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1%. **Para la tinción de Rab5 y Rab7:** las células fueron incubadas durante 30 min. a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía suero de cabra y burro al 2% (Sigma Aldrich), y *Mouse BD FcBlock™* a una dilución 1/200, en PBS-Tween-20 al 0,1%. Luego fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas con los anticuerpos primarios anti-Rab5 (D-11) y -Rab7 (H-50) en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. Después de 2 h. de incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 1 h. en oscuridad con los anticuerpos secundarios marcados con los diferentes fluorocromos: *Alexa Fluor® 647 donkey anti-mouse IgG* y *Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG* en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. **Para la tinción de p47^{phox}:** las células fueron incubadas durante 30 min. a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía suero de cabra al 2%, y *Mouse BD FcBlock™* a una dilución 1/200, en PBS-Tween-20 al 0,1%. Luego fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas con el anticuerpo primario anti-p47^{phox} (H-195) en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. Después de 2 h. de incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS-Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 1 h. en oscuridad con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG* en PBS-Tween-20 al 0,1% que contenía BSA al 1%. Una vez finalizados los tiempos de incubación con los anticuerpos secundarios, las células fueron lavadas dos veces con PBS-Tween-20 al 0,1% y una última vez con PBS.

14.4. Análisis de la fagocitosis de *S. typhimurium*-GFP en pMφ

Los pMφ fueron lavadas con PBS a 37°C e incubadas con IFNγ de ratón a 100 U/ml durante 16 h. Después, las células fueron infectadas con la cepa *S. typhimurium*-GFP a un m.o.i. de 10, a diferentes tiempos de pulso. Después del tratamiento experimental, las células fueron lavadas tres veces con PBS, fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 min. y posteriormente con la solución *BD Cytofix/Cytoperm* durante 20 min. en hielo. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS-Saponina al 0,05% y se procedió a la tinción con 5 µg/ml de falodina-TRIC disuelta en PBS-Saponina al 0,05% durante 40 min. en hielo y

oscuridad. Finalizado el tiempo, las células fueron lavadas dos veces con PBS-Saponina al 0,02% y una última vez con PBS.

Independientemente de la metodología empleada para los análisis mencionados, los portaobjetos de las muestras fueron montados con cubreobjetos usando el medio de montaje con DAPI, *DAPI-mounting medium*, y visualizadas en un microscopio láser confocal Nikon A1, empleando un objetivo de aceite 60x.

Los análisis de microscopía láser confocal fueron realizados empleando el software *NIS-Elements AR Analysis* (Nikon), llevando a cabo los siguientes estudios:

- **Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7**, se visualizó una señal positiva para el marcado con el anticuerpo anti-c-Myc (9E10), en la proyección máxima de las series Z de las células fotografiadas.

- **Análisis de la polimerización de actina**, se midió la intensidad de fluorescencia de la proyección máxima de las series Z de las células fotografiadas.

- **Análisis de colocalización de Rab5, Rab7 y p47^{phox} con *S. typhimurium-GFP***, primeramente, se determinaron regiones de interés (ROIs) en las series Z las cuales contenían *S. typhimurium-GFP* y a continuación, se analizó el coeficiente de correlación de Pearson de cada una de las secciones ópticas recogidas en las series Z.

- **Análisis de la fagocitosis de *S. typhimurium-GFP***, se usaron vistas ortogonales de las células fotografiadas con el fin de analizar la fagocitosis, porcentaje de pMφ infectados y el número de bacterias por célula.

15. Extracción de ARN total y análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR y RT-qPCR

En este apartado se detallará el procedimiento empleado para la extracción del ARN total y la metodología destinada al análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR (PCR con transcripción inversa, *Reverse Transcription PCR*) y RT-qPCR (PCR cuantitativa con transcripción inversa, *quantitative Reverse Transcription PCR*).

15.1. Extracción de ARN total

El ARN total procedente de $1 \cdot 10^6$ células por tratamiento experimental fue obtenido mediante el método de extracción fenólica³⁴⁶. Para ello, las células fueron lavadas con PBS frío tres veces y a continuación, lisadas con 500 μ l del reactivo *TRIZOL* (Invitrogen™) durante 5 min. a temperatura ambiente. Después, se realizó una extracción orgánica con trizol:cloroformo a una proporción en volumen 1:0,2 por centrifugación a 17.000xg durante 15 min. a 4°C. A continuación, la fase acuosa fue tomada, mezclada con 250 μ l de isopropanol (Scharlau), incubada durante 10 min. a temperatura ambiente y centrifugada a 17.000xg durante 10 min. a 4°C. El ARN precipitado en esta centrifugación es lavado con 1 ml de etanol al 75% preparado en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% a 17.000xg durante 5 min. a 4°C. Finalmente, el ARN nuevamente precipitado es secado al aire durante 5 min., resuspendido en 15 μ l de agua DEPC al 0,1% e incubado durante 10 min. a 57.5°C.

La concentración y pureza relativa del ARN se midió en un nanodrop ND100 (Thermo Scientific™) y un microgramo de ARN total de cada una de las muestras fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) con el kit comercial *Reverse Transcription System* (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15.2. Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR

Una vez obtenido el ADNc, éste es amplificado empleando el kit comercial *PCR Master Mix* (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las parejas de cebadores y programas de PCR específicos para el análisis de los distintos retrotanscritos en función del objetivo experimental, se detallan en la **tabla 13**. Finalmente, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 0,6 μ l de bromuro de etidio, a una concentración de 0,5 μ g/ml, durante 30 min. a voltaje constante de 100V. La visualización de los geles se llevó a cabo en un revelador con luz ultravioleta empleando un marcador de peso molecular estándar de 100 pb para el calibrado.

Tabla 13. Cebadores y programas de PCR usados en los análisis mediante RT-PCR.

Análisis de la sobreexpresión de SLAMF8 en RAW264.7		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Programa de PCR
<i>Full-length mouse Slamf8, Forward</i>	ATGTGGTCCCTCTGGAGTCTTCTTC	Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min., seguido de 25 ciclos de amplificación a: 95°C durante 45 seg., 60°C por 1 min. y 30 seg., y 75°C por 5 min. Por último, un paso de extensión final a 75°C durante 13 min.
<i>Full-length mouse Slamf8, Reverse</i>	CTATACGAGGGCATTCTCTGTCTCTGG	
<i>*mouse HPRT1, Forward</i>	CAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGA	
<i>*mouse HPRT1, Reverse</i>	TGCAACCTTAACCATTTGGGGCTGT	
Análisis de los marcadores fenotípicos de los subtipos de Mφ diferenciados de THP-1 <i>in vitro</i>		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Programa de PCR
<i>human CD14, Forward</i>	ACAGGTGCCTAAAGGACTGC	Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de amplificación a: 95°C durante 45 seg., 50°C por 1 min. y 30 seg., y 72°C por 2 min. Por último, un paso de extensión final a 72°C durante 13 min.
<i>human CD14, Reverse</i>	GATCCCGTCCAGTGTCCAGG	
<i>human CXCL10, Forward</i>	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTC	
<i>human CXCL10, Reverse</i>	ATGTAGGGAAGTGATGGGAGAGG	
<i>human CCL18, Forward</i>	CAGCTCACTCTGACCACTTCT	
<i>human CCL18, Reverse</i>	TCTGCCAGGAGGTATAGACGA	
<i>human CD206, Forward</i>	ACCTCACAAGTATCCACACCATC	
<i>human CD206, Reverse</i>	CTTTCATCACCACACAATCCTC	
<i>*human GAPDH, Forward</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	
<i>*human GAPDH, Reverse</i>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
Análisis de la expresión de SLAMF8 en los subtipos de Mφ diferenciados de THP-1 <i>in vitro</i>		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Programa de PCR
<i>human SLAMF8, Forward</i>	TCATTAAGGATGGGAACCTTTATTAG	Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min., seguido de 35 ciclos de amplificación a: 95°C durante 45 seg., 50°C por 1 min. y 30 seg., y 72°C por 2 min. Por último, un paso de extensión final a 72°C durante 13 min.
<i>human SLAMF8, Reverse</i>	CAAAGCAGCTCTGGATGAGA	
<i>*human GAPDH, Forward</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	
<i>*human GAPDH, Reverse</i>	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	

*Los cebadores para *mouse HPRT1* y *human GAPDH*, fueron usados para la amplificación de genes de referencia (*housekeeping genes*).

15.3. Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR

El análisis del nivel de expresión génica del ARNm mediante RT-qPCR, se realizó usando el reactivo *FastStar SYBR Green Master* (Roche) según las instrucciones del fabricante en un termociclador *Quantica Real Time PCR Thermal Cycler* (Techne) y por medio del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 351.

Los niveles de expresión génica fueron normalizados a los niveles basales de expresión. Los pares de cebadores usados y el programa de PCR empleado, se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 14. Cebadores y programa de PCR usado en el análisis mediante RT-qPCR.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Programa de PCR
<i>mouse SLAMF8, Forward</i>	CCTGGCTGGTCTCTTTGGG	Desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min., seguido de 40 ciclos de amplificación a: 94°C durante 30 seg., 65°C por 30 seg., y 72°C por 30 seg. Por último, un paso de disociación (curva de <i>melting</i>) desde 70°C a 90°C.
<i>mouse SLAMF8, Reverse</i>	CGTCAGTGCAAGCATCCTTC	
<i>mouse SLAMF9, Forward</i>	CCCATGAAGGCTCTGTCCTC	
<i>mouse SLAMF9, Reverse</i>	AAGGACCCAACAGAGATGCG	
<i>mouse IL-6, Forward</i>	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	
<i>mouse IL-6, Reverse</i>	GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC	
<i>mouse TLR2, Forward</i>	GGAGGTTGCATATCCCCCAG	
<i>mouse TLR2, Reverse</i>	GAGCAGGGAACACAGGAAGAC	
<i>mouse TLR4, Forward</i>	GGGAGGCACATCTTCTGGAG	
<i>mouse TLR4, Reverse</i>	CCTCTGTTTGCTCAG	
<i>mouse TLR6, Forward</i>	GTCAGTGGACACAGACCAGG	
<i>mouse TLR6, Reverse</i>	ACCCAGGCAGAATCATGCTC	
<i>*mouse HPRT1, Forward</i>	CAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGA	
<i>*mouse HPRT1, Reverse</i>	TGCAACCTTAACCATTTTGGGGCTGT	

*Los cebadores para *mouse HPRT1*, fueron usados para la amplificación del gen de referencia (*housekeeping gene*).

16. Infección *in vivo* con *S. typhimurium*: extracción de células, órganos y determinación de la actividad microbicida

Los ratones fueron infectados i. p. con la misma cantidad de las cepas salvaje y atenuada de *S. typhimurium* ($5 \cdot 10^4$ bacterias en 200 μ l de PBS estéril). A las 48 h. de infección los ratones fueron sacrificados en atmosfera saturada de CO₂ y se tomaron los bazos. A continuación, se procedió a la homogenización manual de los mismos con un homogenizador de tejido tipo *Tenbroeck* de vidrio (ICT S.L.) en agua doble destilada estéril. Una vez homogenizados los órganos, se realizaron diluciones seriadas las cuales fueron cultivadas en placas de LB-agar con y sin ampicilina a 100 μ g/ml por triplicado, bajo condiciones asépticas generadas por la llama de un mechero de alcohol. Las placas fueron incubadas en una estufa *Memmert* (BioLab) a 37°C durante la noche y al día siguiente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC), con el fin de determinar el número de UFC totales en el órgano mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC totales} = \left(\frac{\text{Media de UFC}}{\text{Volumen plaqueado (ml)} \times \text{dilución}} \right) \times \text{volumen total bazo (ml)}$$

Para el análisis de la inducción de iNOS *in vivo* mediante *Western blot*, los ratones se infectaron i. p. con la cepa salvaje *S. typhimurium*, ($5 \cdot 10^4$ bacterias en 200 μ l de PBS estéril). Como control se usaron ratones inyectados con 200 μ l de PBS estéril. A las 48 h. los ratones fueron sacrificados en atmosfera saturada de CO₂ y la población peritoneal fue aislada mediante lavado de la cavidad peritoneal con PBS frío, además de tomar los bazos. Los bazos fueron homogenizados en PBS frío, como se comentó con anterioridad, y una vez obtenido el disgregado celular, éste y la población peritoneal fueron lavados con PBS a 480xg durante 5 min. a 4°C. Ambos precipitados celulares fueron lisados para obtener un extracto proteico total, usando el apropiado tampón de lisis durante 30 min. en hielo. A continuación, se procedió de la misma manera que lo comentado con anterioridad en el punto 11 del apartado materiales y métodos.

En todos los experimentos *in vivo*, los ratones fueron pesados previa infección i. p. y antes del sacrificio. El porcentaje de pérdida de peso se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \left[\left(\frac{\text{Peso (g) día } x}{\text{Peso (g) día } 0} \right) \times 100 \right] - 100$$

17. Análisis estadístico

Las representaciones gráficas de los datos, así como los estudios estadísticos se realizaron mediante el programa informático *GraphPad 5* (GraphPad Software, Inc.). La significancia estadística fue determinada por la prueba t de *Student* (distribución de dos colas con igualdad de varianza entre dos muestras) y ANOVA de una vía con análisis *post-hoc Tukey*. Los resultados se consideraron significativamente diferentes para un valor p menor a 0,05 ($p < 0,05$). El mínimo de datos analizados por muestra se indica en cada resultado.

RESULTADOS

1. Estudio de la modulación de SLAMF8 en las vías de activación y ensamblaje de NOX2, en macrófagos peritoneales de ratón

La activación completa de NOX2 es dependiente de varios procesos fundamentales, entre los que se encuentran la participación de vías de activación encargadas de fosforilar las subunidades citosólicas y de membrana, la activación de Rac-GTPasas y la movilización de las subunidades citosólicas hacia la membrana para su ensamblaje⁸⁷. En estudios previos se ha demostrado que Mφ provenientes de ratones SLAMF8^{-/-} tenían una mayor actividad de la PKC y fosforilación de la subunidad citosólica p40^{phox}, así como una mayor producción de anión superóxido (O_2^-) por esta vía de activación en comparación con Mφ SLAMF8^{+/+} cuando se estimulaban con PMA o bacteria^{218,219}.

En primer lugar, se analizó la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, y de las quinasas p38 y ERK1/2 MAPK directamente implicadas en activar NOX2, con objeto de confirmar una mayor fosforilación de estas proteínas en los pMφ deficientes en SLAMF8, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio³⁴². En segundo lugar, se analizó la activación de NOX2 por medio de la cuantificación del O_2^- producido y la fosforilación de las proteínas objeto de estudio, empleando inhibidores específicos para las distintas vías a analizar. Por último, se analizó la movilización de las subunidades citosólicas y de Rac-GTPasas a la membrana.

1.1. Análisis de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox} a través de la activación directa e indirecta de la PKC, y participación de p38 y ERK1/2 MAPK

La fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana de NOX2 es llevada a cabo por proteínas con actividad quinasa⁸⁷, entre las que destacan la PKC¹²²⁻¹²⁸, p38 y ERK1/2 MAPK^{125,129,130}, y también por quinasas activadas a través de la vía PI3K¹³¹⁻¹³³.

Para confirmar que SLAMF8 modula distintas vías de activación de las subunidades de NOX2, se emplearon pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, que fueron sometidos a estímulos con PMA y LPS puro. La estimulación con PMA nos permite un análisis de la activación directa a través de la PKC³⁵², mientras que la estimulación con LPS puro determinaría además el papel de SLAMF8 a través de la PI3K^{132,353,354}.

Efectivamente, en la estimulación con PMA los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaron un aumento significativo en la fosforilación de los residuos de Ser en las

subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, así como una fosforilación significativamente mayor en el residuo Thr 154 de p40^{phox} en comparación con los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 44A, B).

Comprobamos también que la estimulación con LPS puro, condujo a un aumento significativo de la fosforilación de p40^{phox} en su residuo Thr 154, no detectándose fosforilación en los residuos de Ser para las subunidades p47^{phox} ni p40^{phox} (Fig. 44A, B). Hay que destacar que los niveles de fosforilación de p40^{phox} en el residuo de Thr 154 fueron inferiores bajo la estimulación con LPS puro que con PMA, tanto en los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+} (Fig. 44A, B).

Al analizar la activación de p38 y ERK1/2 MAPK bajo los estímulos de PMA y LPS puro (Fig. 44C, D), comprobamos que los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una fosforilación significativamente mayor para ambas quinasas, lo que indica una mayor activación de la vía de las MAPK en comparación con los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+}.

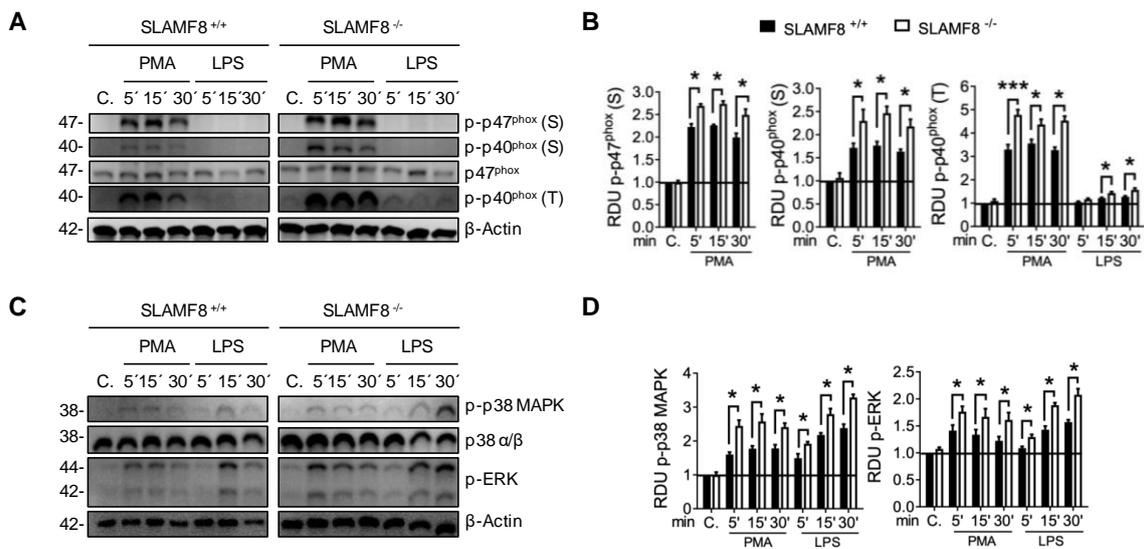


Figura 44. Análisis de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y de p38 y ERK1/2 MAPK en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA y LPS puro mediante Western blot. (A, C) Imágenes representativas de Western blots de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA (100 ng/ml) y LPS puro (10 µg/ml) a diferentes tiempos. **(B, D)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; ***p<0.001. C, control; S, serina; T, treonina.

Estos resultados además de confirmar los hallazgos previamente obtenidos en el laboratorio³⁴², determinaron que SLAMF8 era capaz de modular también de forma negativa la activación de ERK1/2 MAPK, vía directa o indirecta de PKC.

1.2. Análisis de la activación de NOX2 y producción de anión superóxido a través de PKC, p38 MAPK y PI3K empleando inhibidores específicos

Con el fin de verificar la función moduladora de SLAMF8 sobre diferentes vías de activación de NOX2, se analizó la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ y la transducción de señales en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} estimulados con PMA y LPS puro, expuestos previamente a inhibidores específicos para la actividad quinasa de PKC (BIM-1, Bis-Indol-Maleimida I), p38 MAPK (SB203580) y PI3K (LY294002)^{133,144,355-358}.

1.2.1. Análisis de la producción de anión superóxido y de las vías de activación PKC, p38 MAPK y PI3K bajo la estimulación con PMA

El análisis de la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ fue llevado a cabo por medio de un método luminiscente usando lucigenina³⁵⁹, en el que los pMφ fueron previamente tratados bien con el inhibidor BIM-1, SB203580 o con LY294002 antes de someterlos al estímulo con PMA.

Según los resultados, se obtuvo una producción significativamente mayor de $\cdot\text{O}_2^-$ bajo el estímulo con PMA en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 45**), hecho que confirma los resultados anteriores del laboratorio³⁴².

El pretratamiento con el inhibidor de la PKC, BIM-1, condujo a una inhibición total en la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ tanto en los pMφ SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 45**), resultado acorde con la ausencia de detección de p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas mediante *Western blot* (**Fig. 46A, B**). Además, se observó muy baja fosforilación para p38 y ERK1/2 MAPK.

El pretratamiento con el inhibidor de la actividad quinasa de p38 MAPK, SB203580, provocó una reducción en los niveles de producción de $\cdot\text{O}_2^-$ tanto en los pMφ de SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+}. Aún con esta reducción de $\cdot\text{O}_2^-$ en ambos tipos celulares, los pMφ de SLAMF8^{-/-} generaron una cantidad significativamente mayor en comparación con los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 45**).

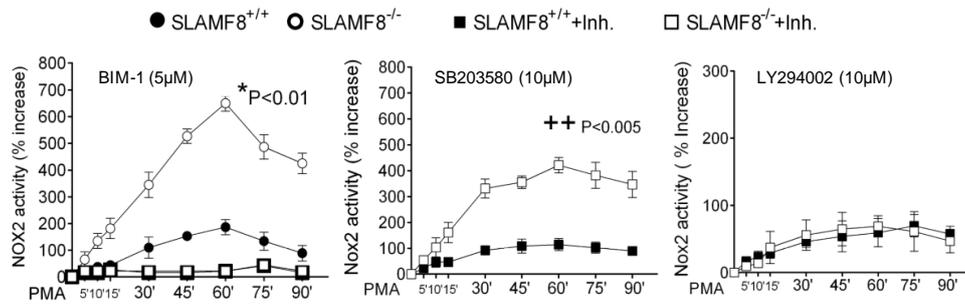


Figura 45. Análisis de la producción de $^{\circ}O_2^-$ en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA y sometidos a la inhibición de las vías PKC, p38 MAPK y PI3K. Representación gráfica de la monitorización de la producción de $^{\circ}O_2^-$ en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA (100 ng/ml) por medio del método de detección basado en el uso de lucigenina y calculada como el incremento de porcentaje sobre t₀ (producción basal). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. * Indican diferencias significativas entre pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} en ausencia de inhibidor; + Indican diferencias significativas entre pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} tratados con el inhibidor indicado. *p<0.01; ++ p<0.005. BIM-1, Bis-Indol-Maleimida I.

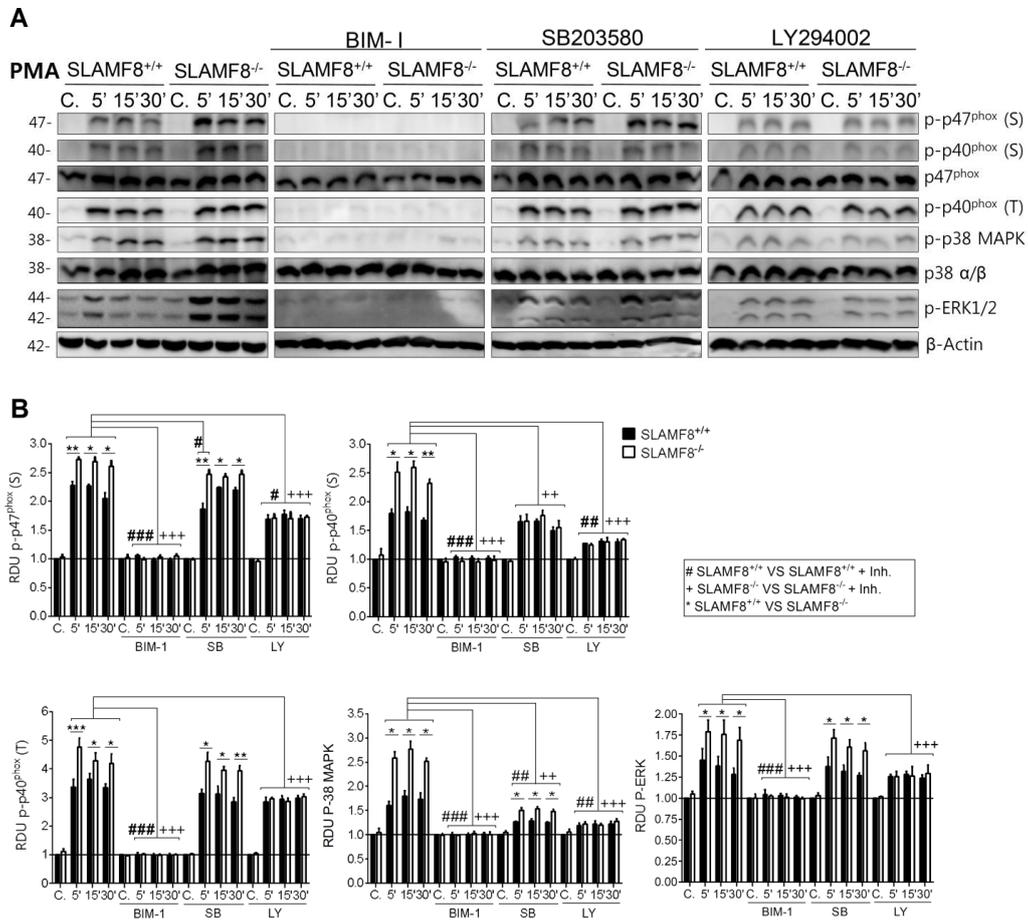


Figura 46. Análisis mediante Western blot de la activación de NOX2 a través de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y de las vías p38 y ERK1/2 MAPK, en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con inhibidores y activados con PMA. (A) Imágenes representativas de Western blots de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 5 µM de Bis-Indol-Maleimida I (BIM-1), 10 µM de SB203580 (SB) o 10 µM de LY294002 (LY) durante una hora y estimulados con 100 ng/ml de PMA a diferentes tiempos. (B) Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *Indican diferencias significativas entre pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. # Indican diferencias entre pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{+/+} tratados con el inhibidor indicado, #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001. + Indican diferencias entre pMφ SLAMF8^{-/-} y SLAMF8^{-/-} tratados con el inhibidor indicado, ++p<0.01; +++p<0.001. C, control; S, serina; T, treonina.

En consonancia con estos resultados, se observó que los pMφ SLAMF8^{-/-} presentaron unos niveles significativamente mayores de p47^{phox} fosforilada en Ser y de p40^{phox} fosforilada en Thr 154, en comparación con los pMφ de SLAMF8^{+/+} (Fig. 46A, B). Los niveles de fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Ser de pMφ SLAMF8^{-/-} se vieron reducidos de manera significativa en comparación con los obtenidos en ausencia del inhibidor SB203580, y se igualaron a los niveles obtenidos para los pMφ SLAMF8^{+/+}. **Esto indica que SLAMF8 modula negativamente la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Ser dependiente de p38 MAPK bajo el estímulo con PMA.**

Para el caso de las subunidades citosólicas en los pMφ SLAMF8^{+/+}, la única reducción significativa en comparación con la obtenida para este tipo de células en ausencia del inhibidor SB203580, tuvo lugar para p47^{phox} fosforilada en Ser a los 5 min. de tratamiento con PMA (Fig. 46A, B).

Al analizar los niveles de fosforilación de p38 MAPK en ambos tipos de pMφ, se observó una reducción significativa en comparación con la obtenida en ausencia del inhibidor SB203580^{145,356} (Fig. 46A, B). A pesar de esta reducción, los niveles de fosforilación continuaron siendo significativamente mayores en los pMφ SLAMF8^{-/-} cuando se compararon con los SLAMF8^{+/+} para todos los tiempos analizados. Por último, tanto los niveles como las diferencias significativamente mayores de fosforilación detectadas para ERK1/2 MAPK en los pMφ SLAMF8^{-/-}, se siguieron manteniendo bajo el pretratamiento con el inhibidor SB203580 (Fig. 46A, B). **Hay que señalar que este resultado confirma además que p-p38 MAPK participa activamente en el proceso de retroalimentación sobre la activación de NOX2.**

El pretratamiento con el inhibidor de la actividad quinasa de PI3K, LY294002, provocó una reducción en la producción de •O₂⁻ casi a niveles basales para ambos tipos de pMφ, no encontrando además, diferencias significativas de producción de •O₂⁻ entre pMφ SLAMF8^{-/-} y SLAMF8^{+/+} (Fig. 45).

Al analizar la fosforilación de las subunidades citosólicas mediante *Western blot* (Fig. 46A, B), se observó que el pretratamiento con LY294002 no solo generó una reducción significativa en los niveles de fosforilación en Ser de p47^{phox} y de p40^{phox} en Ser y Thr 154, tanto en los pMφ SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+} en comparación con las células no tratadas con el inhibidor, sino que sorprendentemente igualó las diferencias de fosforilación de estas subunidades entre los pMφ SLAMF8^{-/-} y los SLAMF8^{+/+}. Hay que destacar que el tratamiento con LY294002 no inhibió completamente la fosforilación de las proteínas analizadas, y que la fosforilación de p40^{phox} en Thr 154 se vio aún más reducida que bajo la inhibición de p38 MAPK.

Al analizar la activación de p38 y ERK1/2 MAPK, igualmente los niveles de fosforilación para ambas quinasas se redujeron bajo el efecto de este inhibidor y no se encontraron diferencias entre los pMφ SLAMF8^{-/-} y SLAMF8^{+/+} (Fig. 46A, B).

Todos estos resultados ponen de manifiesto que SLAMF8 modula significativamente de manera negativa la fosforilación de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox}, y de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK dependientes de la PI3K.

1.2.2. Análisis de las vías de activación PKC, p38 MAPK y PI3K bajo la estimulación con LPS puro

Con el objetivo de confirmar el papel regulador negativo de SLAMF8 sobre la PI3K, se analizó la transducción de señales en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} estimulados con LPS puro, expuestos previamente a los inhibidores anteriormente indicados³⁵⁸.

El pretratamiento con el inhibidor de la PKC provocó una reducción de fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154 hasta los niveles basales en ambos tipos de pMφ (Fig. 47A, B). La fosforilación de p38 se vio reducida para ambas muestras, mientras que ERK1/2 MAPK solo se redujo a los 15 min. en los pMφ SLAMF8^{+/+}, en comparación con las células no tratadas con el inhibidor. No obstante, se observó una fosforilación significativamente mayor en pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} para ambas proteínas (Fig. 47A, B). Estos resultados indicarían que SLAMF8 modula de manera negativa y dependiente de PKC la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154 bajo estimulación con LPS puro. Independientemente, sugieren activación e intervención de la PKC en la vía p38 MAPK, o un posible efecto del inhibidor en la vía de activación de p38 MAPK en la estimulación con LPS puro.

Al analizar los datos obtenidos del pretratamiento con el inhibidor SB203580 bajo la estimulación con LPS puro, se observó que los niveles de fosforilación en Thr 154 para la subunidad p40^{phox} se mantuvieron significativamente mayores en los pMφ SLAMF8^{-/-}, a los 15 y 30 min., en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 47A, B). El uso de este inhibidor solamente generó una reducción significativa de p40^{phox} en Thr 154 en los pMφ SLAMF8^{-/-} a los 5 min. de tratamiento con LPS puro, en comparación con las células no tratadas con el inhibidor. Este resultado parece indicar que SLAMF8 modula levemente la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154 a través de p38 MAPK bajo el estímulo con LPS puro, al menos en las condiciones utilizadas.

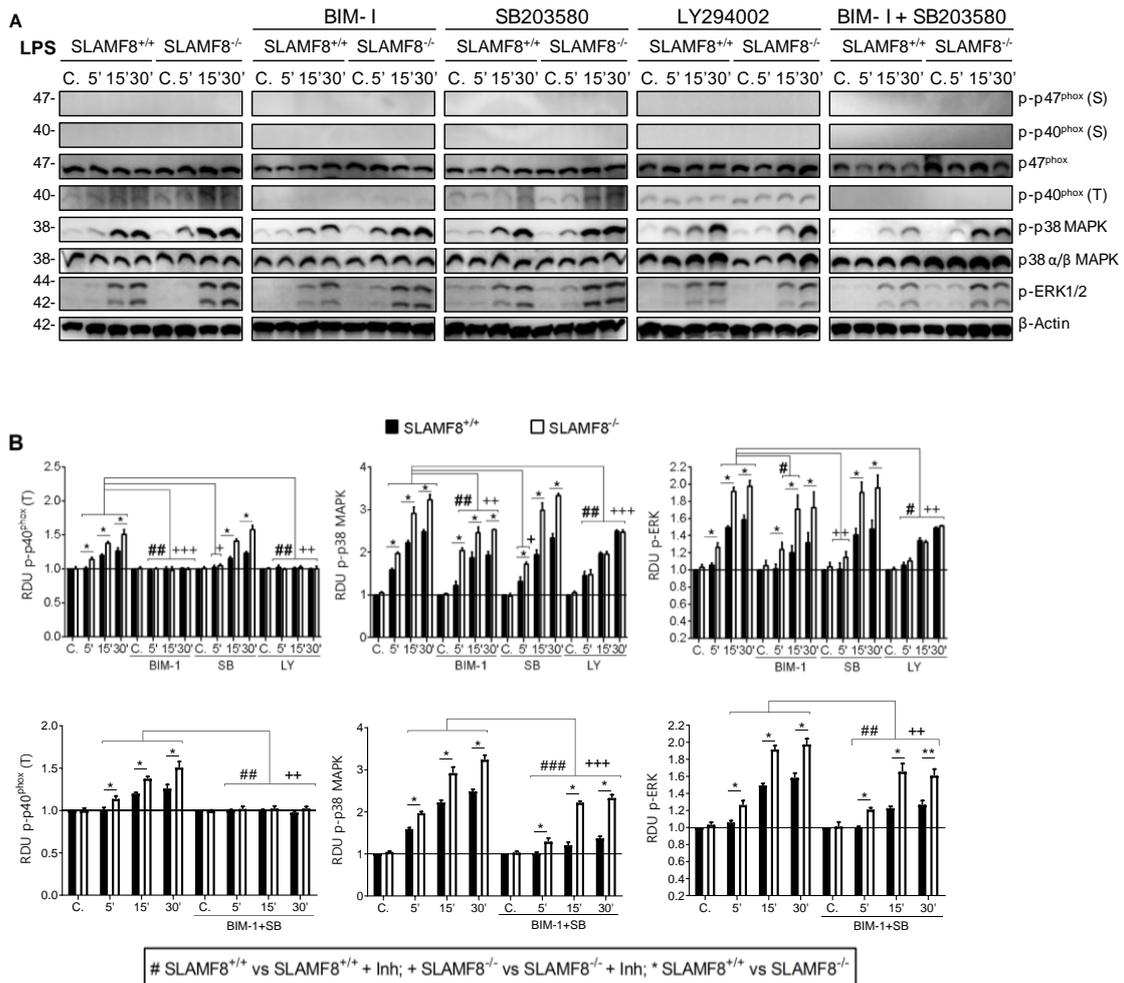


Figura 47. Análisis mediante Western blot de la activación de NOX2 a través de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y de las vías p38 y ERK1/2 MAPK, en pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con inhibidores y activados con LPS puro. (A) Imágenes representativas de Western blots de pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 5 μ M de Bis-Indol-Maleimida I (BIM-1), 10 μ M de SB203580 (SB) o 10 μ M de LY294002 (LY) durante una hora y estimulados con 10 μ g/ml de LPS puro a diferentes tiempos. (B) Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. *Indican diferencias significativas entre pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, *p<0.05. # Indican diferencias entre pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} tratados con el inhibidor indicado, #p<0.05; ##p<0.01. + Indican diferencias entre pM ϕ SLAMF8^{-/-} y SLAMF8^{-/-} tratados con el inhibidor indicado, ++p<0.01; +++p<0.001. C, control; S, serina; T, treonina.

La fosforilación de p38 MAPK bajo el efecto del pretratamiento con SB203580, también se vio afectada a los 5 min. de tratamiento con LPS puro para el caso de los pM ϕ SLAMF8^{-/-}, donde el nivel de fosforilación fue significativamente menor en comparación con los no tratados con el inhibidor. Para todos los tiempos analizados, incluido los 5 min., se obtuvo una fosforilación significativamente mayor de p38 MAPK en los pM ϕ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 47A, B).

Para el caso de la activación de ERK1/2 MAPK bajo el pretratamiento con SB203580, se observó una mayor fosforilación en los pM ϕ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+},

obteniéndose significación estadística para 15 y 30 min. de tratamiento con LPS puro. Además, el uso de este inhibidor solamente generó una reducción significativa de fosforilación de ERK1/2 MAPK en los pMφ SLAMF8^{-/-} a los 5 min. de tratamiento, en comparación con las células no tratadas con el inhibidor (mismo resultado que el obtenido para p40^{phox} fosforilado en Thr 154) (Fig. 47A, B).

El pretratamiento combinado de los inhibidores BIM-1 y SB203580, generó en ambos tipos de pMφ una reducción a los niveles basales de fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154. Para el caso de p38 y ERK1/2 MAPK, la fosforilación de estas vías se vio reducida tanto en los pMφ SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+}, en comparación con las células no tratadas con el inhibidor, pero los pMφ SLAMF8^{-/-} obtuvieron una fosforilación significativamente mayor en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 47A, B).

Estos resultados confirman que SLAMF8 modula de forma negativa y dependiente de PKC la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154, e independientemente de PKC la fosforilación de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK, bajo el estímulo con LPS puro.

El pretratamiento con el inhibidor LY294002 bajo la estimulación con LPS provocó la reducción total de la fosforilación de p40^{phox} en Thr 154 tanto en los pMφ SLAMF8^{-/-} como en los SLAMF8^{+/+}. Para el caso de las vías p38 y ERK1/2 MAPK, su fosforilación se vio significativamente reducida para ambos tipos celulares en comparación con las células no tratadas con el inhibidor, no encontrándose de nuevo diferencias significativas entre los pMφ SLAMF8^{-/-} y los SLAMF8^{+/+} (Fig. 47A, B). **Este resultado indica que SLAMF8 modula de forma negativa la activación de la fosforilación de p40^{phox} en Thr 154 y la fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK dependiente de la PI3K bajo la estimulación con LPS puro.**

En conjunto todos estos resultados confirman que SLAMF8 es capaz de modular negativamente la activación de NOX2 a través de la vía PI3K.

La fosforilación en las subunidades citosólicas genera cambios conformacionales que facilitan y promueven las interacciones necesarias para el correcto ensamblaje y activación de NOX2^{87,156}. Una mayor fosforilación de las subunidades citosólicas supondría una mayor movilización de éstas hacia el componente de membrana, el flavocitocromo b₅₈₈, para generar una NOX2 activa. Con el fin de determinar si la modulación de SLAMF8 afecta a la movilización de las subunidades citosólicas se analizó este proceso. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente punto.

1.3. Análisis de la movilización de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana

En un estudio previo del laboratorio se observó un incremento del reclutamiento de Rac-GTPasas en la fracción de membrana de los pMφ deficientes en SLAMF8³⁴². Con el fin de confirmar este resultado, se llevó a cabo un análisis en profundidad de movilización de varias subunidades citosólicas de NOX2, atendiendo además a la pureza obtenida para la fracción de membrana por medio de la presencia de calnexina³⁶⁰. Para ello, se recurrió al análisis mediante *Western blot* de extractos citosólicos y de membrana obtenidos del fraccionamiento subcelular mediante ultracentrifugación a partir de extractos totales procedentes de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} estimulados con PMA.

Al analizar los resultados, se observó que los pMφ SLAMF8^{-/-} presentaron en los extractos de membrana una mayor presencia de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas en Ser, en comparación con los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 48A, B). Además, al analizar la pequeña Rho GTPasa Rac, proteína fundamental para el ensamblaje de NOX2 y que su forma activa está asociada a membrana^{162,361,362}, se observó una mayor presencia de ésta en los extractos de membrana de los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+}.

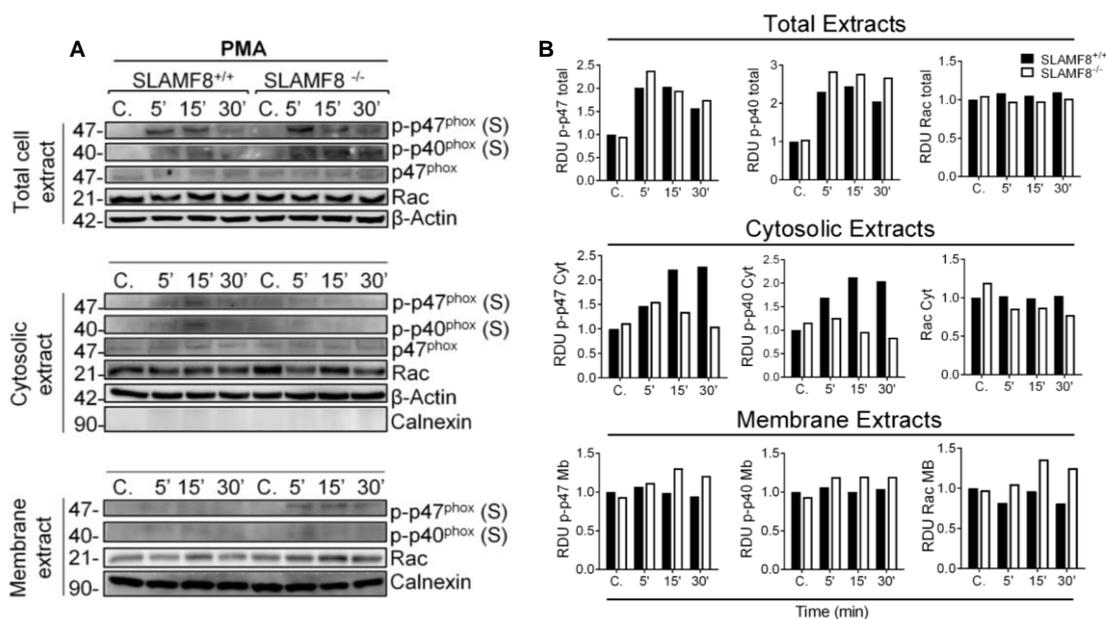


Figura 48. Análisis de la movilización de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA mediante *Western blot*. (A) Imágenes representativas de *Western blots* de extractos totales, citosólicos y de membrana de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA (100 ng/ml) a diferentes tiempos. La ausencia y presencia de Calnexina indica la pureza de los extractos citosólicos y de membrana respectivamente. (B) Representación gráfica de las unidades de densitometría relativa (RDU) obtenidas de las proteínas indicadas en A. C, control; S, serina; T, treonina. Experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Cuando se analizaron los niveles de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas en Ser y de Rac-GTPasas en los extractos citosólicos, se observó una mayor presencia de éstas en los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 48A, B). Esta relación inversa entre los niveles de presencia de estas subunidades en el citosol y membrana, nos indicó que la movilización de estas subunidades desde el citosol a la membrana fue mayor en los pMφ SLAMF8^{-/-} que en los SLAMF8^{+/+}. Por medio del análisis de los extractos totales, se confirmó que una mayor presencia de estas subunidades en membrana era debido al efecto modulador de SLAMF8 y no a una mayor cantidad de proteína total para cualquiera de las subunidades analizadas, ya que no se encontraron diferencias de carga entre los pMφ de SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} para los tiempos analizados. Además, la pureza de los extractos citosólicos y de membrana fue garantizada por la ausencia de calnexina en la fracción citosólica y presencia de esta proteína en la de membrana³⁶⁰ (Fig. 48A, B).

Estos resultados confirman una mayor movilización desde el citosol a la membrana de Rac-GTPasas y muestran una mayor movilidad y ensamblaje de las subunidades de p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas hacia la membrana celular en los pMφ SLAMF8^{-/-}.

Una mayor movilización de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} en sus formas fosforiladas y de Rac-GTPasas a membrana, indicaría un mayor ensamblaje de NOX2^{363,364} en los pMφ SLAMF8^{-/-}. En el ensamblado de NOX2, además de las interacciones proteína-proteína promovidas por las fosforilaciones de las subunidades citosólicas, es fundamental las interacciones proteína-lípido promovidas por la acción de la PI3K, que por medio de su actividad quinasa genera lípidos de anclaje para las subunidades citosólicas previamente fosforiladas¹⁷⁴. Además, como se ha demostrado anteriormente, la activación con LPS puro indujo una mayor activación de p40^{phox} en Thr 154 y de las MAPK. **En conjunto todos estos resultados confirman que SLAMF8 es capaz de modular negativamente la activación de NOX2 y de los pMφ vía PI3K.**

2. Estudio del efecto de SLAMF8 en la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos peritoneales de ratón

La reorganización del citoesqueleto de actina es un proceso clave en las funciones del M ϕ . Este proceso es capaz de participar en la migración del M ϕ al foco inflamatorio, fagocitosis, formación del fagosoma y presentación antigénica³⁶⁵. La reorganización del citoesqueleto de actina, es un proceso altamente regulado por medio de Rac-GTPasas^{118,119} a través de la activación de p38 MAPK³⁶⁶. Dado que los resultados anteriores mostraron que SLAMF8 actúa como un regulador negativo de la activación de Rac-GTPasas y de la vía p38 MAPK, se planteó la hipótesis de si SLAMF8 pudiera tener un efecto funcional sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.

Para resolver esta hipótesis, se emplearon pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, los cuales fueron sometidos a activación con PMA para inducir la formación de filamentos de actina³⁶⁷ y posteriormente mediante el uso de faloidina marcada con Tetrametilrodamina-Isotiocianato (TRIC, *Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate*) se evaluó la reorganización del citoesqueleto de actina por medio de microscopia láser confocal.

La faloidina es una toxina procedente del hongo *Amanita phalloides*, que tiene la capacidad de unirse específicamente a la forma polimerizada de la actina, F-actina, inhibiendo su despolimerización, por lo que su uso conjugado con un fluorocromo permite la visualización y cuantificación de la intensidad de la polimerización de actina en la célula³⁶⁸.

En base al análisis de la intensidad de fluorescencia, este estudio reveló que los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una intensidad de fluorescencia mayor y estadísticamente significativa en comparación con los pM ϕ de SLAMF8^{+/+} (**Fig. 49A, B**).

Estos resultados ponen de manifiesto que en ausencia de SLAMF8 hay una mayor polimerización de actina, bajo la estimulación con PMA, que afecta a la reorganización del citoesqueleto. Esto nos lleva a afirmar que SLAMF8 modula la activación del M ϕ y podría modular también la progresión en infecciones graves. Por ello, nos propusimos analizar el impacto de este receptor en un proceso infeccioso por *Salmonella*.

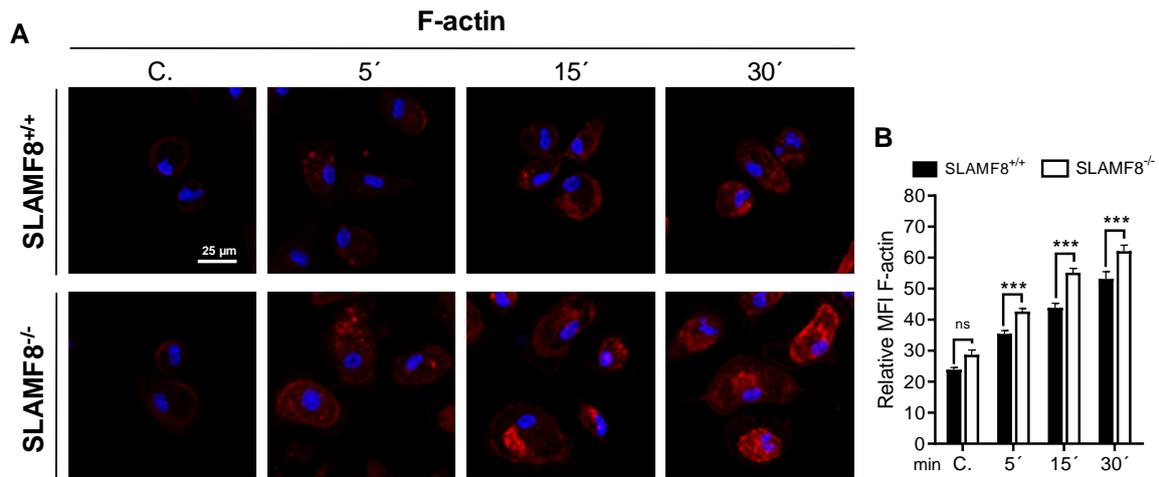


Figura 49. Análisis de la reorganización del citoesqueleto de actina en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA mediante microscopia láser confocal. (A) Imágenes de proyección máxima obtenidas mediante microscopia láser confocal en las que se muestra la polimerización de actina mediante la tinción con faloidina-TRIC (rojo) y núcleos celulares teñidos con DAPI (azul) en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} activados con PMA (100 ng/ml) a diferentes tiempos. Barra de escala 25 μm. **(B)** Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*) determinada a partir de las imágenes de proyección máxima realizadas. Los valores indican la MFI obtenida ± error estándar de la media. Determinación realizada en 50 células por condición experimental. ***p<0.001. C, control. ns, ausencia de significancia estadística. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

3. Estudio de la modulación de SLAMF8 en la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS, en un modelo de infección con *Salmonella in vitro*

Salmonella enterica serovar typhimurium (*S. typhimurium*), es un patógeno Gram negativo facultativo intracelular, principal causante de gastroenteritis en humanos, estando su virulencia asociada a su capacidad invasiva y de supresión del sistema inmunitario. Este patógeno es usado en ratones como modelo de fiebre tifoidea en humanos y de gastroenteritis tanto *in vitro* como *in vivo*³⁶⁹.

Dado que SLAMF8 aumenta su expresión bajo la estimulación con IFN γ ²¹⁸ y la activación de los M ϕ a través de esta citoquina es fundamental en la infección por *Salmonella*³⁷⁰, se planteó analizar el impacto de SLAMF8 en un modelo de infección con *S. typhimurium*.

Para ello, se empleó un modelo de infección *in vitro* en el que los pM ϕ fueron sometidos a infección con *S. typhimurium*. Este modelo simula un proceso de infección, consistente en un periodo de incubación de 15 min. con *S. typhimurium* (m.o.i. 10), seguido de diferentes tiempos de post-infección bajo un protocolo de control con Gentamicina.

En primer lugar, se analizó la expresión de *Slamf8* mediante RT-qPCR en pM ϕ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ e infectados con el modelo anteriormente descrito, con objeto de determinar si la infección por *Salmonella* afectaba a la expresión de *Slamf8* (Fig. 50).

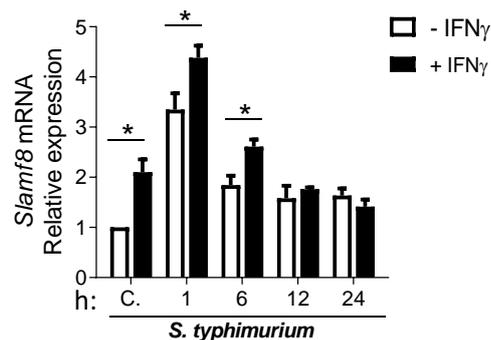


Figura 50. Análisis de la expresión de *Slamf8* mediante RT-qPCR en pM ϕ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ e infectados con *S. typhimurium in vitro*. Representación gráfica de la expresión del ARNm de *Slamf8* en pM ϕ SLAMF8^{+/+} estimulados o no con IFN γ 100 U/ml durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección (h.). La expresión génica fue normalizada al nivel basal de expresión de las células no tratadas. Los datos fueron analizados por medio del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando la expresión de *HPRT1* como gen de referencia. Los valores indican la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

La estimulación con IFN γ aumentó la expresión de *Slamf8*, al igual que en resultados anteriores²¹⁸, y fue aún mayor bajo la infección con *S. typhimurium*, alcanzando su máximo a la hora de post-infección y mostrando diferencias hasta las 6 h. de post-infección con *S. typhimurium*.

El siguiente objetivo planteado fue analizar si la ausencia de SLAMF8 alteraba el proceso de infección por *Salmonella* en M ϕ de ratón pretratados con IFN γ .

En el proceso de infección con *Salmonella* se producen diferentes estadios de desarrollo en el interior de la célula hospedadora en una estructura denominada SCV (*Salmonella-Containing Vacuole*). Esta estructura va madurando a lo largo del tiempo en diferentes etapas que consisten en: SCV temprano (menos de 30 min.), intermedio (desde 30 min. a 5 h.) y tardío (más de 5 h.), momento en el que se produce la replicación del microorganismo³⁷¹⁻³⁷³. Estos estadios y sus características a nivel molecular, están regulados por la capacidad que tiene *S. typhimurium* de modificar la actividad microbicida de la célula hospedadora por medio de proteínas efectoras introducidas a través de su aparato de secreción tipo III (T3SS)^{374,375}. Entre estas modificaciones se encuentra la capacidad de reducir la activación de NOX2 e iNOS^{376,377}.

Por medio del modelo de infección *in vitro* anteriormente descrito, se analizó: **1)** la activación de NOX2 e iNOS, y las vías p38, ERK1/2 MAPK, **2)** su modulación a través de la PKC, p38 MAPK y PI3K, empleando inhibidores específicos, **3)** la progresión del fagosoma mediante el análisis del reclutamiento de las pequeñas GTPasas Rab5 y Rab7, y de la subunidad p47^{phox} hacia el SCV y **4)** la expresión de *il-6*.

3.1. Análisis de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, inducción de iNOS, y participación de p38 y ERK1/2 MAPK en pM ϕ infectados con *S. typhimurium*

Con objeto de estudiar el efecto de *Salmonella* en ausencia de SLAMF8, decidimos analizar en los diferentes estadios de desarrollo del SCV la activación de NOX2 e iNOS. Para ello, los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} fueron sometidos al modelo de infección con *S. typhimurium* comentado anteriormente, y se analizaron las muestras a diferentes tiempos de post-infección: temprano (10 min.), intermedio (30 min., 1 y 3 h.) y tardío (6 h.). Es importante recordar que, al contrario de los estímulos agonistas con PMA y LPS puro empleados anteriormente, estos experimentos están realizados con la bacteria completa por lo que la estimulación se producirá por varios receptores innatos.

Los resultados mostraron que, los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una fosforilación significativamente mayor en Ser de la subunidad citosólica p47^{phox} desde la hora de post-infección y de p40^{phox} en el residuo Thr 154 desde la media hora de post-infección (**Fig. 51A, B**). Hay que apuntar que, no se detectó fosforilación de p40^{phox} en Ser en este modelo, a los tiempos y m.o.i. de infección utilizados. También se obtuvo un aumento significativo en la inducción de iNOS detectada a partir de las 3 h. de post-infección en los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} en comparación con SLAMF8^{+/+}.

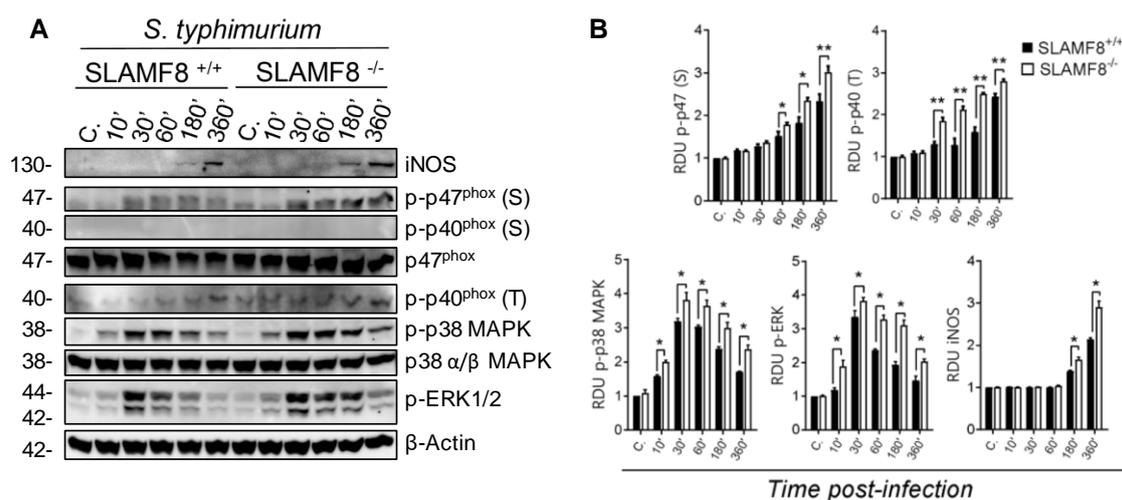


Figura 51. Análisis de la activación de NOX2 a través de la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, inducción de iNOS, y fosforilación de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium* *in vitro*, mediante Western blot. (A) Imágenes representativas de Western blots de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con IFNγ 100 U/ml durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación y expresión relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa y expresión fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; **p<0.01. C, control; S, serina; T, treonina.

Al analizar las vías de activación de p38 y ERK1/2 MAPK, se observó que los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una fosforilación significativamente mayor para ambas proteínas en comparación con los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+}, desde los 10 min. de post-infección (**Fig. 51A, B**).

Según estos resultados, en ausencia de SLAMF8 la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox} de NOX2, la inducción de iNOS, y la activación de p38 y ERK1/2 MAPK, es superior en el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium*. Estos resultados indican además, que la intervención de SLAMF8 modula la inducción de iNOS.

3.2. Análisis de la activación de NOX2 e iNOS a través de las vías PKC, p38 MAPK y PI3K en pMφ infectados con *S. typhimurium*

Dados los resultados anteriores, seguidamente, analizamos el efecto de los inhibidores específicos previamente descritos para cada vía de activación en el modelo de infección por *Salmonella*.

El análisis de producción de NO fue llevado a cabo por medio de un método colorimétrico usando reactivo de Griess³⁵⁰, en el que se analizaron los sobrenadantes de los pMφ empleados con las diferentes condiciones experimentales planteadas.

El pretratamiento con el inhibidor de la PKC, BIM-1, provocó una reducción de la fosforilación de la subunidad citosólica p47^{phox} en Ser en ambos tipos de pMφ, pero aún con esta reducción, los niveles de fosforilación fueron significativamente mayores desde las 3 h. post-infección en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los de SLAMF8^{+/+}. En ambos tipos de pMφ, se inhibió la fosforilación en Thr 154 de la subunidad p40^{phox} bajo el pretratamiento con este inhibidor (Fig. 52A, B). Este resultado indica que en ausencia de SLAMF8 y bajo la estimulación con *S. typhimurium* *in vitro*, se produce un incremento de la activación de NOX2, específicamente por la fosforilación de p47^{phox} en Ser a través de la PKC y otras vías de activación, y por la fosforilación en Thr 154 de la subunidad p40^{phox} de manera dependiente de la PKC.

Al analizar los niveles de fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK (Fig. 52A, B), se observó una reducción para ambos tipos de muestras, aunque aún había diferencias significativamente mayores de fosforilación para estas proteínas en pMφ SLAMF8^{-/-} que en los SLAMF8^{+/+}. Para el caso de p38 MAPK estas diferencias fueron detectadas hasta los 60 y 180 min. post-infección y hasta 1 h. para ERK1/2 MAPK.

Los niveles de expresión de iNOS se redujeron en ambos tipos de pMφ bajo el tratamiento con BIM-1. Esta reducción hizo que desaparecieran las diferencias significativas a las 3 h. de post-infección. En cambio, aunque la reducción fue muy acentuada para el caso de los pMφ SLAMF8^{-/-} a las 6 h., se siguió detectando una mayor expresión de iNOS en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 52A, B). Estos resultados fueron concordantes con los niveles de NO de los sobrenadantes, en los que se detectó una mayor producción en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los de SLAMF8^{+/+} para el mismo tiempo de post-infección. El tratamiento con BIM-1 dio lugar a una reducción de la producción de NO en ambas muestras, manteniéndose las diferencias significativas a las 6h. entre ambas (Fig. 52C).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que en ausencia de SLAMF8, el control sobre la activación de NOX2 por *Salmonella* está alterado, mostrando una mayor fosforilación de la subunidad p47^{phox} en Ser, p40^{phox} en Thr 154, de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK y una mayor inducción de iNOS *in vitro*, y siendo estos eventos dependientes de la PKC, además de por otras vías de activación.

El pretratamiento con el inhibidor de la actividad quinasa de p38 MAPK, SB203580, provocó en ambos tipos de pMφ una reducción hasta los niveles basales de fosforilación en la subunidad citosólica p47^{phox} en Ser a la hora de post-infección, y también a las 3 h. para el caso de los pMφ SLAMF8^{+/+}, pero se siguieron detectando diferencias significativamente mayores en pMφ SLAMF8^{-/-} a las 3 y 6 h. de post-infección en comparación con los SLAMF8^{+/+}. El mismo resultado fue obtenido para el caso de la subunidad citosólica p40^{phox} fosforilada en Thr 154, donde a diferencia de lo ocurrido con el inhibidor de la PKC, el tratamiento con SB203580 no inhibió la fosforilación de esta subunidad (Fig. 52A, B).

Para el caso de la vía de activación p38 MAPK, los niveles de fosforilación se redujeron para todos los tiempos de post-infección en los pMφ SLAMF8^{+/+} y únicamente para las 6 h. de post-infección en los pMφ SLAMF8^{-/-}. Esto provocó que los niveles de fosforilación de esta vía fuesen aún más significativos y mayores en los pMφ SLAMF8^{-/-} a la hora y 3 h. de post-infección, en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 52A, B).

Al analizar la vía de activación ERK1/2 MAPK bajo el efecto de este inhibidor, se observó que los niveles de fosforilación de esta vía fueron principalmente reducidos en los pMφ SLAMF8^{-/-}. Aún con esta reducción, la fosforilación de ERK1/2 MAPK fue significativamente mayor en los pMφ SLAMF8^{-/-} a la hora y 3 h. de post-infección en comparación con los SLAMF8^{+/+}. Resultado parecido al obtenido para la vía de activación p38 MAPK (Fig. 52A, B).

Los niveles de expresión de iNOS bajo el tratamiento con SB203580 se redujeron en ambos tipos de pMφ a las 3 h. de post-infección y únicamente para los pMφ SLAMF8^{-/-} a las 6 h. de post-infección (Fig. 52A, B).

Similar a lo obtenido para el tratamiento con el inhibidor de la PKC, los niveles de expresión de iNOS se redujeron en ambos tipos de pMφ. Esta reducción hizo que desaparecieran las diferencias significativas a las 3 h. de post-infección y aunque la reducción no fue tan acentuada para el caso de los pMφ SLAMF8^{-/-} a las 6 h., se siguió detectando una mayor expresión de iNOS en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 52A, B). De nuevo, estos resultados fueron concordantes con los niveles de NO detectados en los

sobrenadantes, en los que se observó una reducción de los niveles de NO en ambas muestras tratadas con SB203580, aunque se detectó una mayor producción en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los de SLAMF8^{+/+} a las 6 h de post-infección (Fig. 52C).

Estos resultados confirman que en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*, la ausencia de SLAMF8 afecta a la fosforilación de las subunidades p47^{phox} en Ser y p40^{phox} en Thr 154, la fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK, vía p38 MAPK, así como la inducción de iNOS en los diferentes estadios de maduración del SCV.

El pretratamiento combinado de los inhibidores BIM-1 y SB203580, generó en ambos tipos de pMφ una reducción prácticamente a los niveles basales de fosforilación en las subunidades p47^{phox} en Ser y p40^{phox} en Thr 154, además de la fosforilación en p38 MAPK. En el caso de ERK1/2 MAPK, se detectaron niveles muy bajos de fosforilación bajo el tratamiento con ambos inhibidores. En ninguna de estas proteínas se observaron diferencias significativas de fosforilación cuando se compararon los pMφ SLAMF8^{-/-} con los SLAMF8^{+/+} (Fig. 52A, B). Finalmente, la inducción de iNOS bajo el efecto de estos dos inhibidores fue significativamente mayor en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los de SLAMF8^{+/+} a las 6 h. de post-infección y fue confirmado por los niveles de NO detectados en los sobrenadantes (Fig. 52C).

Basándonos en los resultados obtenidos se confirma la dependencia de fosforilación en Thr 154 de la subunidad p40^{phox} a través de la PKC, y de la participación de PKC y p38 MAPK en la fosforilación de p47^{phox} en Ser y activación de p38 y ERK1/2 MAPK en el modelo de infección por *Salmonella*. Además, demuestran que SLAMF8 regula negativamente la inducción de iNOS a través de vías independientes de PKC y p38 MAPK, en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

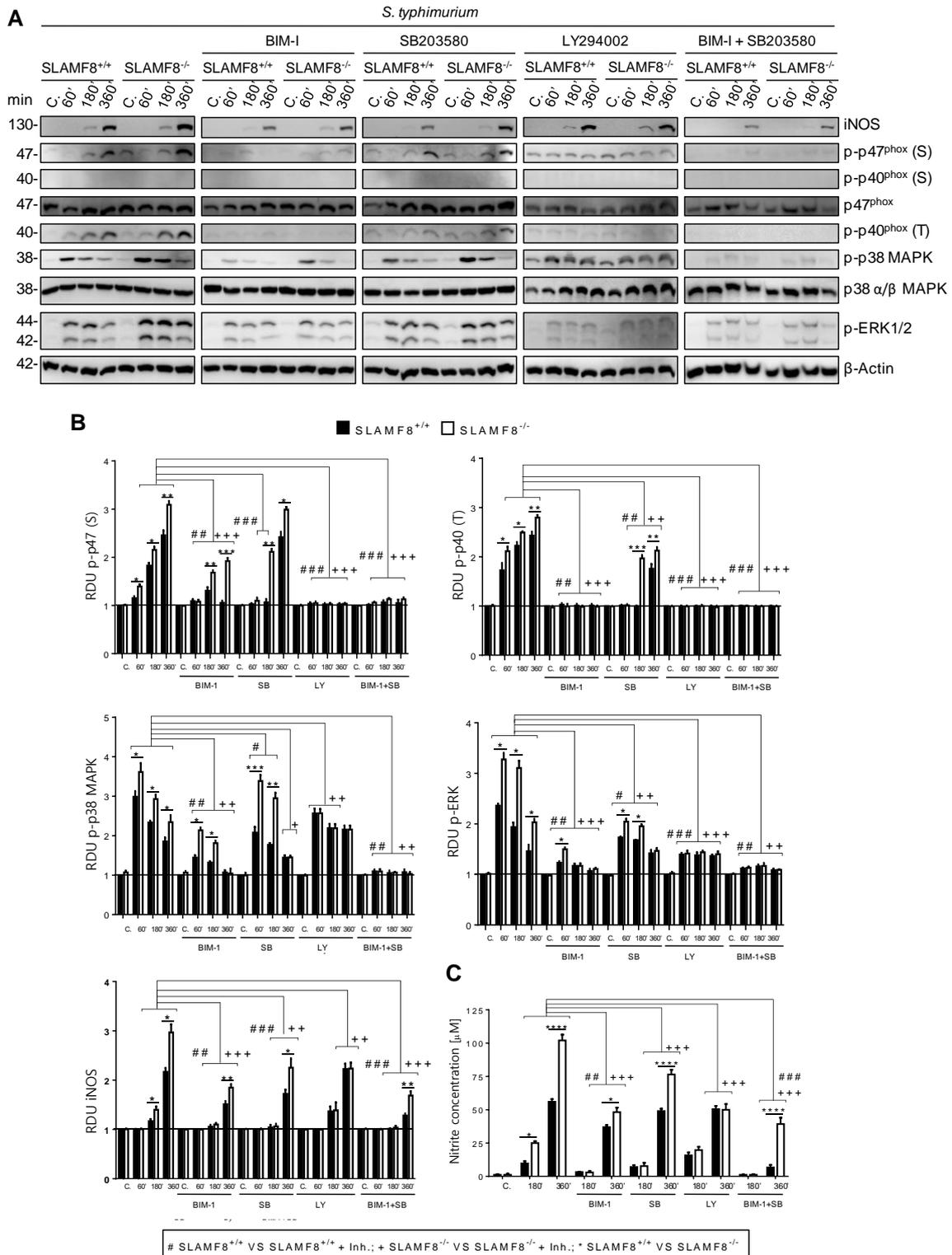


Figura 52. Análisis de la activación de NOX2, inducción de iNOS y producción de NO, y activación de las vías p38 y ERK1/2 MAPK en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con inhibidores e infectados con *S. typhimurium in vitro*. (A) Imágenes representativas de Western blots de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 5 μM de Bis-Indol-Maleimida I (BIM-1), 10 μM de SB203580 (SB) o 10 μM de LY294002 (LY) durante una hora e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. (B) Representación gráfica de los niveles de fosforilación y expresión relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa y expresión fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; **p<0.01. (C) Representación gráfica de la producción de NO [μM] en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con los inhibidores anteriormente descritos e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. Determinación realizada mediante la reacción de Griess. Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; *p<0.001; ****p<0.0001. C, control; S, serina; T, treonina.**

El pretratamiento con el inhibidor de la actividad quinasa de PI3K, LY294002, generó la inhibición de la fosforilación de p47^{phox} en Ser y de p40^{phox} en Thr 154 en ambos tipos de pMφ. Al analizar la fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK bajo este inhibidor, las diferencias de fosforilación entre los pMφ SLAMF8^{-/-} y los SLAMF8^{+/+} desaparecen, mostrando ambas muestras los mismos niveles para ambas proteínas (Fig. 52A, B). Finalmente, para la inducción de iNOS tampoco se obtuvieron diferencias significativas de expresión de esta proteína en ambos tipos de pMφ confirmado esto, además, por lo niveles de NO detectados en los sobrenadantes (Fig. 52C).

Estos resultados confirman la dependencia de fosforilación de p47^{phox} en Ser y de p40^{phox} en Thr 154 a través de la PI3K, y de que SLAMF8 regula de manera negativa a través de la PI3K las vías p38 y ERK1/2 MAPK, además de la inducción de iNOS. En consecuencia, la ausencia de SLAMF8 altera la inhibición de estas enzimas y probablemente la composición molecular del SCV en sus diferentes estadios de maduración en el modelo de infección. En conjunto, SLAMF8 modula negativamente la activación del Mφ en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

3.3. Análisis de la progresión del fagosoma mediante la determinación del reclutamiento de las GTPasas Rab5 y Rab7, y de la subunidad p47^{phox} hacia el SCV

El proceso de maduración y progresión del SCV implica una interacción continua y dinámica con el sistema endosomal del hospedador^{378,379}. En base a los resultados anteriores, nos planteamos comprobar si la presencia o no de SLAMF8 afecta de alguna forma a la progresión del SCV, y el reclutamiento de proteínas asociadas a éste.

Para ello se emplearon pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, previamente tratados con IFNγ e infectados con una cepa de *S. typhimurium* que expresaba GFP (*S. typhimurium*-GFP). A través de distintos tiempos de post-infección, se analizaron diferentes estadios de maduración del SCV mediante microscopía láser confocal, por medio de la visualización de marcadores específicos para cada uno de ellos. Se analizó el SCV temprano (menos de 30 min. de post-infección) a través de la presencia de la pequeña GTPasa Rab5³⁷⁹ y el SCV intermedio (más de 30 min. de post-infección) por la presencia de Rab7³⁸⁰.

El análisis de las imágenes obtenidas permitió determinar el grado de colocalización de *S. typhimurium*-GFP con los marcadores específicos de cada estadio del SCV (Rab5 para el temprano y Rab7 para el intermedio) a través del coeficiente de correlación de Pearson^{371,381} (**Fig. 53A, C, D**). Los resultados mostraron diferencias significativamente mayores en el grado de colocalización de Rab5 con *S. typhimurium*-GFP en el SCV temprano (**Fig. 53C**) y de Rab7 con *S. typhimurium*-GFP en el SCV intermedio (**Fig. 53D**), en los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} comparados con los SLAMF8^{+/+}. **Estos resultados sugieren que en ausencia de SLAMF8, los pMφ presentan una mayor fusión de fagosoma-lisosoma y una progresión alterada del SCV en estas condiciones.**

Para reforzar el resultado de que los pMφ SLAMF8^{-/-} presentaban una mayor activación de NOX2 bajo la infección con *S. typhimurium*, se analizó la colocación de la subunidad citosólica p47^{phox} con *S. typhimurium*-GFP por medio de microscopía láser confocal. De nuevo, por medio del coeficiente de correlación de Pearson, se determinó el grado de colocalización existente entre p47^{phox} con *S. typhimurium*-GFP en pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} (**Fig. 53B, E**). Los análisis revelaron un mayor reclutamiento de p47^{phox} hacia *S. typhimurium*-GFP en los pMφ de ratones SLAMF8^{-/-} comparados con los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 53E**). **Estos resultados corroboraron el incremento de activación de NOX2 bajo la infección con *S. typhimurium* en pMφ SLAMF8^{-/-} y junto con los anteriores, que la ausencia de SLAMF8 contribuye a una alteración de la progresión del SCV.**

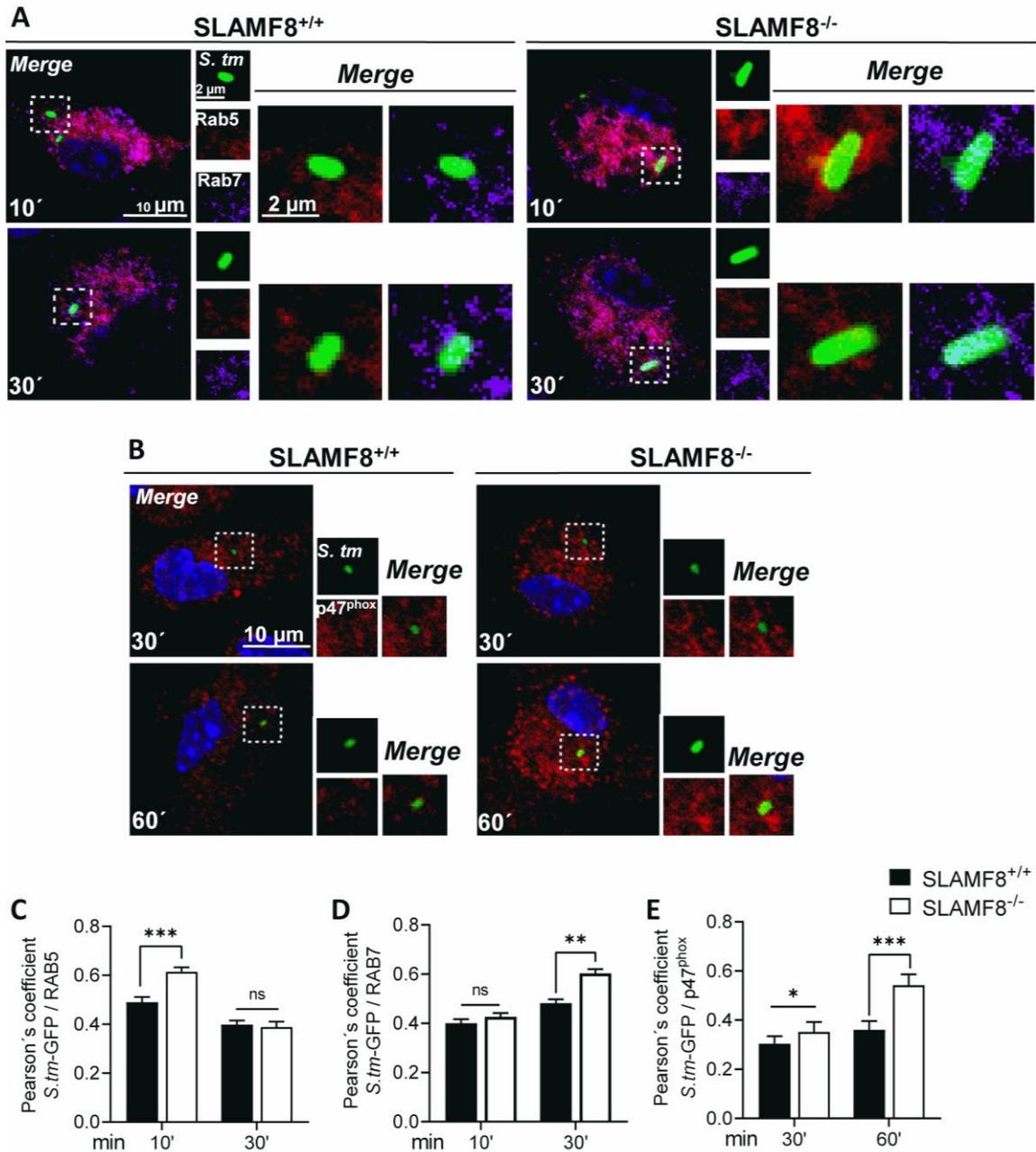


Figura 53. Análisis del reclutamiento de proteínas Rab5, Rab7 y p47^{phox} hacia el SCV en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium*-GFP, mediante microscopía láser confocal. (A) Imágenes representativas de pMφ infectados con *S. typhimurium*-GFP (m.o.i. 10) (verde) a diferentes tiempos, teñidos con anticuerpos para la detección de Rab5 (rojo) y Rab7 (morado). (B) Imágenes representativas de pMφ infectados con *S. typhimurium*-GFP (m.o.i. 10) (verde) a diferentes tiempos, teñidos con anticuerpo para la detección de p47^{phox} (rojo). Núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). Las imágenes muestran un corte-Z, con los marcadores combinados (*Merge*), así como por separado, además de mostrar imágenes de gran aumento. (C, D) Representación gráfica del grado de colocalización de Rab5 y Rab7 con *S. typhimurium*-GFP en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. (E) Representación gráfica del grado de colocalización de p47^{phox} con *S. typhimurium*-GFP en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. Los valores indican la media ± error estándar de un experimento representativo de 3 realizados. Determinaciones realizadas en 50 células por condición experimental. *p<0.05; **p<0.01; *p<0.001. *S. tm*, *S. typhimurium*-GFP; ns, ausencia de significancia estadística. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.**

Estos hallazgos hicieron plantearnos si los efectos observados eran debidos a una posible mayor capacidad fagocítica de la bacteria en los pMφ SLAMF8^{-/-}. Para analizar la fagocitosis en detalle, se llevó a cabo una tinción con faloidina-TRIC para poder visualizar *S. typhimurium*-GFP en el interior de la célula. Bajo esta metodología se analizó la fagocitosis en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, evaluando el porcentaje de pMφ infectados y el número de microorganismos fagocitados por célula.

Los resultados no mostraron diferencias significativas ni en el porcentaje de células infectadas (**Fig. 54A, B**), ni en el número de *S. typhimurium*-GFP fagocitadas por célula (**Fig. 54A, C**), cuando se compararon pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. **En base a esto, SLAMF8 no regula el proceso de fagocitosis de *Salmonella* e indicaría que la mayor activación encontrada en los pMφ SLAMF8^{-/-} no se debe a un aumento de la cantidad de bacteria internalizada.**

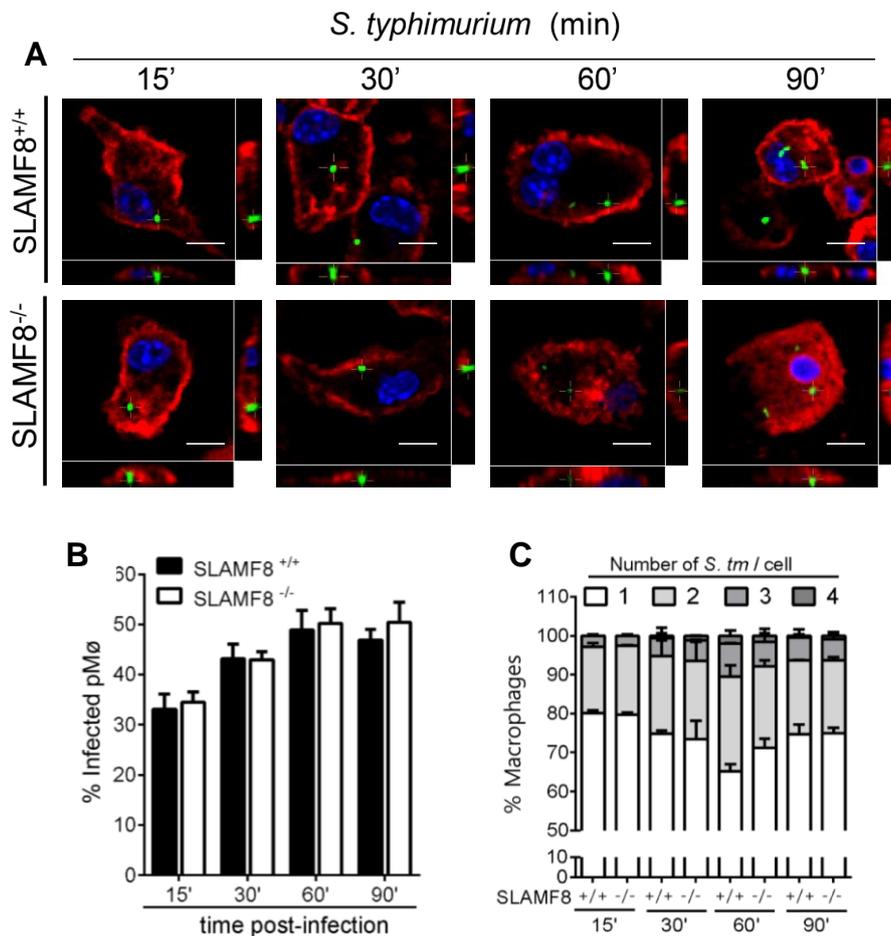


Figura 54. Análisis de la fagocitosis en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium*-GFP, mediante microscopía láser confocal. (A) Imágenes representativas de pMφ infectados con *S. typhimurium*-GFP (m.o.i. 10) (verde) a diferentes tiempos, teñidos con faloidina-TRIC (rojo) para visualizar la bacteria fagocitada y núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). Las imágenes muestran un corte-Z y la vista ortogonal de la imagen, para visualizar *S. typhimurium*-GFP en el interior celular. Barra de escala 10 μm (60X). (B) Representación gráfica del porcentaje de pMφ infectados con *S. typhimurium*-GFP. (C) Representación gráfica del número de *S. typhimurium*-GFP fagocitadas por célula. Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. Determinación realizada en 100 células por condición experimental.

3.4. Análisis de la expresión de *il-6* en pMφ infectados con *S. typhimurium*

Los Mφ son células cruciales en la defensa contra los procesos infecciosos provocados por *Salmonella*. Estas células pueden mediar inicialmente en la protección restringiendo el proceso replicativo por medio de los mecanismos microbicidas³⁸² pero además, tienen un papel fundamental en la producción de citoquinas que pueden tener diferentes funciones en estos procesos infecciosos^{383,384}. Entre ellas, cabe destacar la IL-6, que aunque es considerada de manera general como una citoquina proinflamatoria³⁸⁵, puede tener múltiples efectos biológicos³⁸⁶. Tal es así que, se ha observado su función antiinflamatoria³⁸⁷, de protección de la barrera epitelial³⁸⁸ y frente a procesos de sepsis y endotoxemia^{389,390}.

Debido a que los resultados sugieren que SLAMF8 modula la actividad de los Mφ y parece tener un papel importante en la defensa contra este microorganismo, analizamos si SLAMF8 pudiera regular la expresión de *il-6*. Por ello se analizó la expresión mediante RT-qPCR de esta citoquina en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con IFNγ e infectados con *S. typhimurium* *in vitro*. Los resultados mostraron una expresión significativamente mayor de *il-6* en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 55). Estos resultados indican que SLAMF8 regula también de manera negativa la expresión de *il-6* en el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium*.

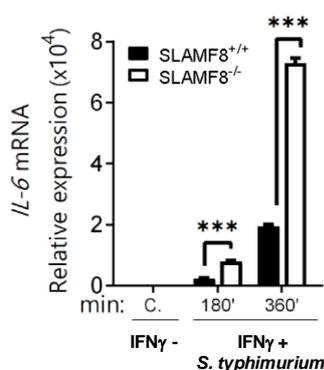


Figura 55. Análisis de la expresión de *il-6* mediante RT-qPCR en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con IFNγ e infectados con *S. typhimurium* *in vitro*. Representación gráfica de la expresión del ARNm de *il-6*, en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 100 U/ml de IFNγ durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. La expresión génica fue normalizada al nivel basal de expresión de las células no tratadas con IFNγ. Los datos fueron analizados por medio del método 2^{-ΔΔct} usando la expresión de *HPRT1* como gen de referencia. Los valores indican la media ± error estándar de la media de 2 experimentos independientes. ***p<0.001. C, control.

En base al análisis de todos los resultados obtenidos en este punto, se pone de manifiesto que SLAMF8 modula negativamente la transducción de señales y la respuesta inflamatoria durante la infección con *S. typhimurium* en pMφ de ratón.

4. Estudio de la expresión de *tlrs* y *Slamf9* en pMφ deficientes en SLAMF8 infectados con *S. typhimurium*

El receptor SLAMF8 al igual que otros miembros de la familia, presenta interacciones de tipo homotípico²¹⁹. Recientemente, se ha descrito en un modelo *in vivo* de sepsis con LPS, que podría actuar conjuntamente con SLAMF9²⁸⁶. Según este estudio, la interacción combinada de SLAMF8 con SLAMF9 es capaz de modular la respuesta frente al LPS a través de TLR4 en ratones protegiendo en ausencia de ambos, de lesiones hepáticas producidas por LPS²⁸⁶.

Teniendo en cuenta los resultados de Zeng *et al.* (2020)²⁸⁶ y que en modelos de infección con *S. typhimurium* se ha determinado la importancia del receptor TLR2 además del TLR4 en el reconocimiento de este microorganismo³⁹¹, nos planteamos analizar si SLAMF8 podría estar regulando la expresión de estos receptores en pMφ bajo el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro* y en consecuencia, si su ausencia afecta a la activación de los pMφ.

En primer lugar, para determinar la relación entre SLAMF8 y SLAMF9 en este modelo, se analizó la cinética de expresión de *Slamf9* mediante RT-qPCR en pMφ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ , e infectados con *S. typhimurium in vitro* (Fig. 56), y se comparó con la expresión de *Slamf8* analizada anteriormente (Fig. 50).

Al analizar los resultados se observó que, al igual que con *Slamf8*²¹⁸, la estimulación con IFN γ generaba un aumento de expresión de *Slamf9*³⁹² en comparación con las células no pretratadas. La infección con *Salmonella* también generó un incremento de expresión de *Slamf9* respecto a los pMφ tratados solo con IFN γ , aunque la cinética de expresión fue diferente a la de *Slamf8*. La expresión de *Slamf9* aumentó en todos los tiempos de estimulación y se mantuvo notablemente alta hasta tiempos más tardíos, alcanzando el máximo a las 12 h., para luego descender a las 24 h. de post-infección. Su expresión fue significativamente mayor cuando los pMφ fueron pretratados con IFN γ en todos los tiempos analizados. La expresión de *Slamf8* en cambio, mostró un aumento, siendo máximo a la hora y descendió a tiempos más largos de post-infección.

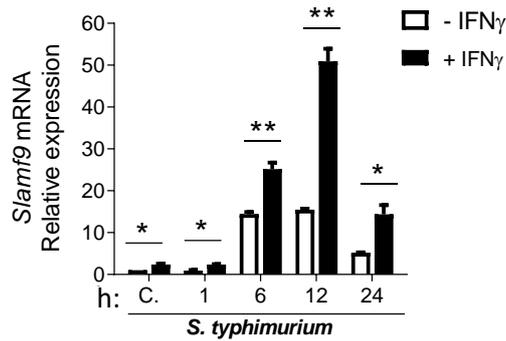


Figura 56. Análisis de la expresión de *Slamf9* mediante RT-qPCR en pMφ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ e infectados con *S. typhimurium* in vitro. Representación gráfica de la expresión del ARNm de *Slamf9* en pMφ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ 100 U/ml durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. La expresión génica fue normalizada al nivel basal de expresión de las células no tratadas. Los datos fueron analizados por medio del método $2^{-\Delta\Delta ct}$ usando la expresión de *HPRT1* como gen de referencia. Los valores indican la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. C, control.

Según los resultados obtenidos, existe una cinética de expresión diferente del ARNm de *Slamf8* y *Slamf9* en los pMφ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ , e infectados con *S. typhimurium* in vitro, a los tiempos analizados.

A continuación, se analizó la expresión mediante RT-qPCR de *tlr2*, *tlr4*, *tlr6*, *Slamf8* y *Slamf9* en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con IFN γ e infectados con *S. typhimurium* in vitro.

Atendiendo a la expresión de los *tlrs* y de acuerdo con los resultados obtenidos (Fig. 57), el pretratamiento con IFN γ no generó una diferencia de expresión para ninguno de ellos entre los pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. Al analizar en ambos tipos de pMφ la cinética de expresión de los *tlrs* en función del tiempo de post-infección con *S. typhimurium*, se observó un aumento de expresión para *tlr2* y *tlr6*, y una ligera disminución para el *tlr4*, encontrando pequeñas diferencias aunque significativamente mayores en *tlr2* y *tlr4* a la hora de post-infección en pMφ SLAMF8^{-/-}, en comparación con los procedentes de ratones SLAMF8^{+/+}.

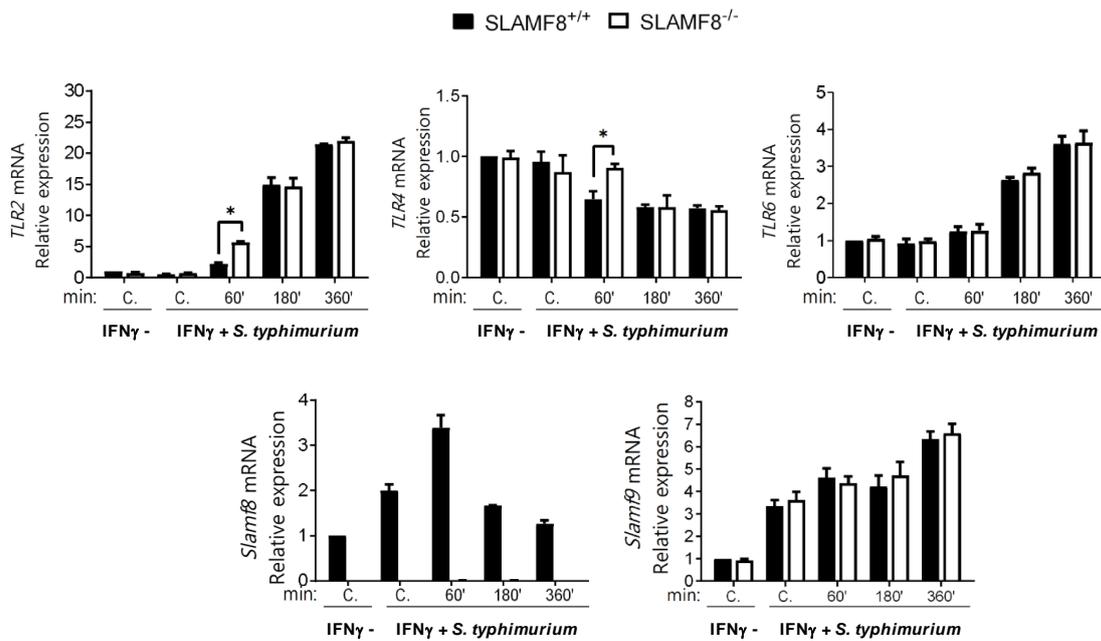


Figura 57. Análisis de la expresión de *tlr2*, *tlr4*, *tlr6*, *Slamf8* y *Slamf9* mediante RT-qPCR en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con IFNγ e infectados con *S. typhimurium* *in vitro*. Representación gráfica de la expresión del ARNm de *tlr2*, *tlr4*, *tlr6*, *Slamf8* y *Slamf9* en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 100 U/ml de IFNγ durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. La expresión génica fue normalizada al nivel basal de expresión de las células no tratadas con IFNγ. Los datos fueron analizados por medio del método $2^{-\Delta\Delta ct}$ usando la expresión de *HPRT1* como gen de referencia. Los valores indican la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$. C, control.

Estos resultados muestran que SLAMF8 podría modular ligeramente la expresión de *tlr4* y *tlr2* a la hora de post-infección con *S. typhimurium* *in vitro*.

Al analizar la expresión de *Slamf8* y *Slamf9* bajo estas condiciones (Fig. 57), se observó al igual que en anteriores análisis, un aumento de expresión de *Slamf8* en pMφ SLAMF8^{+/+} al inicio de la estimulación, descendiendo a partir de la primera hora. Para *Slamf9*, el pretratamiento con IFNγ generó un aumento de expresión en los pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} a todos los tiempos. La expresión de *Slamf9* aumentó en función del tiempo de post-infección con *S. typhimurium*, confirmando distintos patrones de expresión entre ambas, pero no se encontraron diferencias de expresión entre ambos tipos de pMφ.

Estos resultados indican que SLAMF8 no modula la expresión de *Slamf9* en el modelo de infección con *S. typhimurium* *in vitro*.

5. Estudio de la función de SLAMF8 sobre la vía de activación Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, en pMφ infectados con *S. typhimurium*

La activación de los Mφ es inducida por diferentes estímulos como pueden ser: el reconocimiento de patrones de microorganismos a través de distintos receptores (por ejemplo, los TLRs), mediante citoquinas secretadas por células inmunitarias y también por otros mediadores químicos, estando todos estos procesos altamente regulados por quinasas pertenecientes a la familia de las Src³⁹³.

Estudios previos han descrito la participación de las Src quinasas en el proceso de internalización y activación de NOX2 a través de la PI3K, bajo la infección con *Salmonella*³⁹⁴ y estimulación con LPS³⁹⁵, además de su función sobre la reorganización del citoesqueleto de actina³⁹⁶. También se ha descrito que la fosfatasa SHP-1, está implicada en la regulación negativa de la producción de ROS por NOX2 a través de la vía PI3K-Rac GTPasa^{397,398}.

En base a estos estudios y dado que los resultados mostrados indican que SLAMF8 puede regular de manera negativa la activación de mecanismos microbicidas en pMφ infectados con *S. typhimurium*, así como la reorganización del citoesqueleto de actina, planteamos analizar el papel de SLAMF8 sobre la regulación de la transmisión de señales a través de las Src y su relación con SHP-1 en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

En primer lugar, se evaluó el efecto del pretratamiento con IFNγ sobre la activación de las Src quinasas, la fosfatasa SHP-1 y también sobre la fosforilación y expresión del resto de proteínas previamente estudiadas en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, mediante *Western blot*. Cabe destacar, que el anticuerpo empleado para la detección de la quinasa Src fosforilada en tirosina (Tyr) 416, forma activa de la enzima, es capaz de reconocer este residuo fosforilado en los miembros de la familia de las Src quinasa: Src, Fyn, Yes, Hck y Lyn.

Según estos resultados el pretratamiento con IFNγ generó en los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} una fosforilación significativamente mayor en el residuo Tyr 416 de las Src quinasas, en comparación con los de SLAMF8^{+/+}. Al analizar la fosforilación del residuo Tyr 564 de SHP-1 y la fosforilación de ERK1/2 MAPK, se observó que aumentaban bajo el pretratamiento con IFNγ, no encontrándose diferencias entre pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. No se observaron diferencias para el resto de las proteínas analizadas entre ambos tipos de muestras (**Fig. 58A, B**).

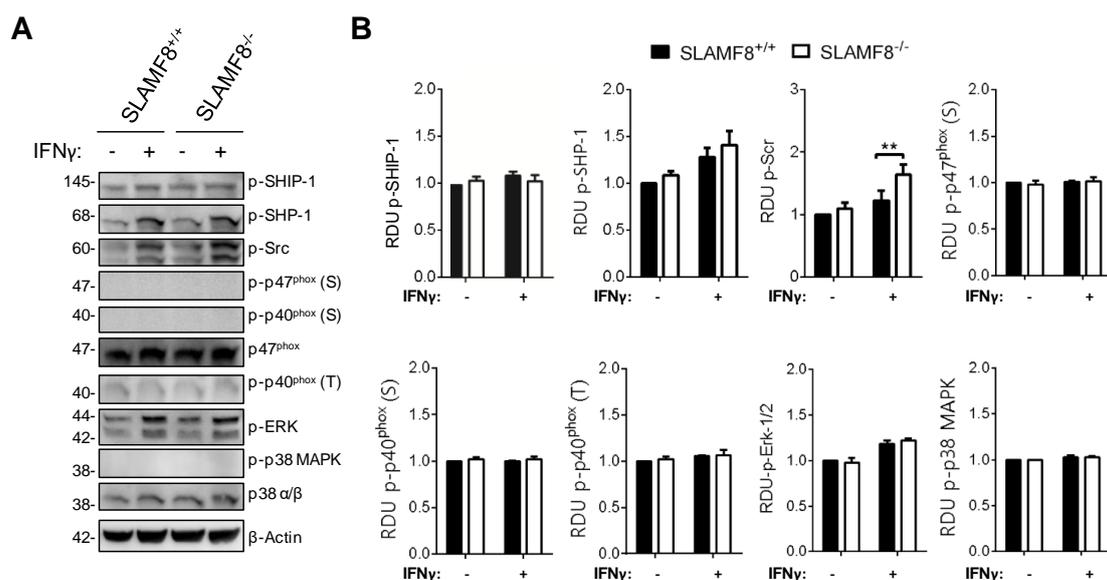


Figura 58. Análisis del efecto del pretratamiento con IFN γ sobre la activación de las Src quinasas, la fosfatasa SHP-1 y sobre la fosforilación y expresión de proteínas previamente analizadas en pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} mediante Western blot. (A) Imágenes representativas de Western blots de pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados o no con 100 U/ml de IFN γ durante 16 h. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación y expresión relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa y expresión fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$.

A continuación, se analizó también mediante Western blot la activación de las Src quinasas y la fosfatasa SHP-1 en pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, previamente tratados con IFN γ e infectados con *S. typhimurium* a diferentes tiempos de infección.

Los resultados mostraron que la infección con *S. typhimurium* generó en los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} niveles de fosforilación significativamente mayores en el residuo Tyr 416 de las Src quinasas, en comparación con los de SLAMF8^{+/+}. Al analizar los niveles de fosforilación del residuo Tyr 564 de SHP-1, se observaron niveles significativamente mayores en los pM ϕ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+}. Además, para el caso de los pM ϕ de SLAMF8^{-/-} se observó un aumento de fosforilación de esta fosfatasa muy inferior en función del tiempo de infección, a diferencia del obtenido para el caso de los pM ϕ de SLAMF8^{+/+} (Fig. 59A, B).

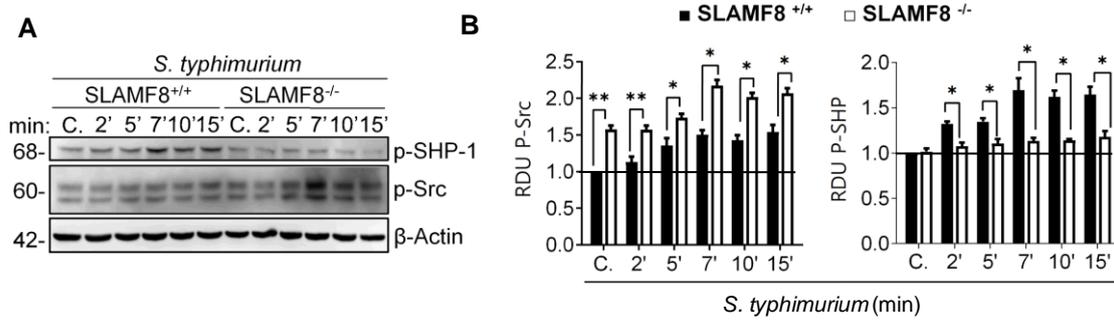


Figura 59. Análisis de la activación de las Src quinasas y de la fosfatasa SHP-1 en pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium* *in vitro*, mediante Western blot. (A) Imágenes representativas de Western blots de pMφ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} pretratados con 100 U/ml de IFNγ durante 16 h. e infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de infección. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación y expresión relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación y expresión fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; **p<0.01. C, control.

Estos resultados indican que la ausencia de SLAMF8 produce un incremento de la activación de las Src quinasas, además de provocar un detrimento de la activación de la fosfatasa SHP-1 en el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium*.

6. Estudio del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de macrófagos de ratón

Los resultados anteriores demuestran que SLAMF8 es capaz de regular negativamente procesos de activación en pM ϕ de ratón bajo diferentes estímulos *in vitro*. Por otro lado, se había demostrado que la sobreexpresión de SLAMF8 reduce la actividad de NOX2²¹⁸. Con el fin de confirmar estas funciones asociadas a este miembro de la familia del SLAM, analizamos la sobreexpresión de SLAMF8 en M ϕ de ratón.

Para realizar este abordaje, primeramente, fue necesario generar una línea celular que sobreexpresase el SLAMF8 murino. La línea celular empleada para ello, fue la línea tumoral de M ϕ de ratón RAW264.7³⁴³. Esta línea celular fue transfectada de manera estable por electroporación con un vector de sobreexpresión que contenía la secuencia codificante para el *full length* de SLAMF8 murino. Posteriormente por un proceso de selección clonal, se consiguió un clon capaz de sobreexpresar SLAMF8 de manera constitutiva y estable. La validación de la sobreexpresión de SLAMF8 fue realizada por medio del análisis de la expresión del ARNm de *Slamf8*, además de la detección antigénica de la proteína total transducida a través del reconocimiento de una etiqueta c-Myc humana mediante *Western blot* y microscopía láser confocal. Los detalles sobre los procedimientos seguidos para la obtención y chequeo de la sobreexpresión estable de SLAMF8 se encuentran recogidos en el correspondiente punto de materiales y métodos de esta tesis doctoral.

Una vez establecido en cultivo la línea celular de RAW264.7 capaz de sobreexpresar SLAMF8, esta fue sometida a la estimulación *in vitro* con PMA, LPS puro y *S. typhimurium*, para analizar la activación bajo estos estímulos.

6.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de NOX2, y de p38 y ERK1/2 MAPK, bajo la estimulación con PMA y LPS puro

En primer lugar, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 bajo la estimulación con PMA. Los resultados mostraron que, las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron una fosforilación significativamente menor de los residuos de Ser en las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, así como una fosforilación significativamente menor en el residuo Thr 154 de p40^{phox} en comparación con las células RAW264.7 que no sobreexpresaban SLAMF8 (*Mock*). Al analizar la activación de p38 y ERK1/2 MAPK, también se observó una fosforilación significativamente menor en las células que sobreexpresaban SLAMF8 en comparación con las que no (**Fig. 60A, B**).

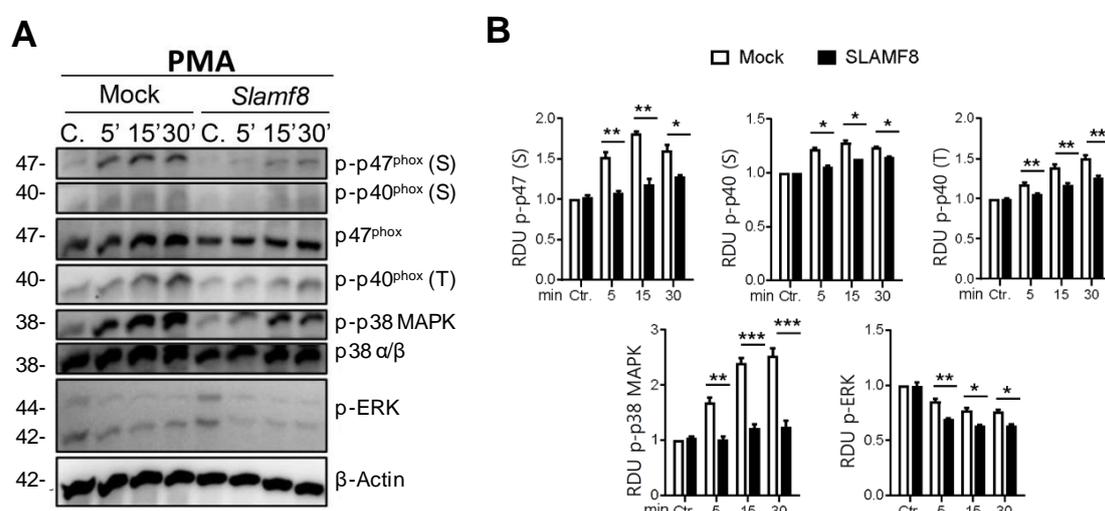


Figura 60. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y de p38 y ERK1/2 MAPK, bajo la estimulación con PMA, mediante Western blot. (A) Imágenes representativas de *Western blots* de RAW264.7 que sobreexpresan SLAMF8 o no (*Mock*), activados con PMA (100 ng/ml) a diferentes tiempos. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa fueron normalizados con el apropiado control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; ***p<0.001. C, Ctr. control; S, serina; T, treonina.

En segundo lugar, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 bajo la estimulación con LPS puro. Bajo este estímulo, se observó también que las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron una fosforilación significativamente menor de los residuos de Ser en las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, así como una fosforilación significativamente menor en el residuo Thr 154 de p40^{phox} en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8 (*Mock*). Al analizar la activación de p38 y ERK1/2 MAPK, se observó una fosforilación

significativamente menor a los 15 min. para estas proteínas en las células que sobreexpresaban SLAMF8, en comparación con las que no (Fig. 61A, B).

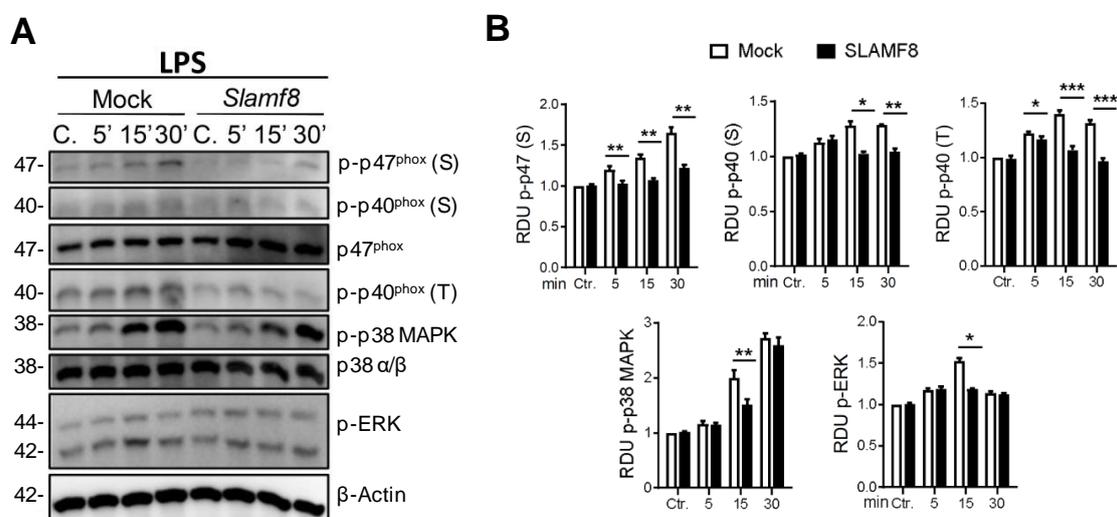


Figura 61. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y de p38 y ERK1/2 MAPK, bajo la estimulación con LPS puro, mediante Western blot. (A) Imágenes representativas de Western blots de RAW264.7 que sobreexpresan SLAMF8 o no (*Mock*), activados con LPS puro (10 µg/ml) a diferentes tiempos. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa fueron normalizados con el apropiado control de carga y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05; ***p<0.001. C, Ctr. control; S, serina; T, treonina.

Según los resultados obtenidos, se confirma que SLAMF8 es capaz de regular negativamente en Mφ de ratón la activación de NOX2, y las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK bajo la estimulación con PMA y LPS puro *in vitro*.

6.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de NOX2, iNOS, p38 y ERK1/2 MAPK, y la expresión de *il-6* bajo la infección con *S. typhimurium*

Por último, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 bajo la infección con *S. typhimurium*. Los resultados mostraron que, las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron una fosforilación significativamente menor de los residuos de Ser en las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox}, así como una fosforilación significativamente menor en el residuo Thr 154 de p40^{phox} en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8 (*Mock*). Además, se observó al analizar la activación de p38 y ERK1/2 MAPK, una

fosforilación significativamente menor para estas proteínas en las células que sobreexpresaban SLAMF8 en comparación con las que no (**Fig. 62A, B**).

También se detectó que, las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron una expresión significativa menor de iNOS a las 6 h. de post-infección, en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8 (**Fig. 62A, B**). Este último resultado fue concordante con los niveles de NO detectados en los sobrenadantes, en los que se detectó una menor producción en las células que sobreexpresaban SLAMF8, en comparación con las que no (**Fig. 62C**).

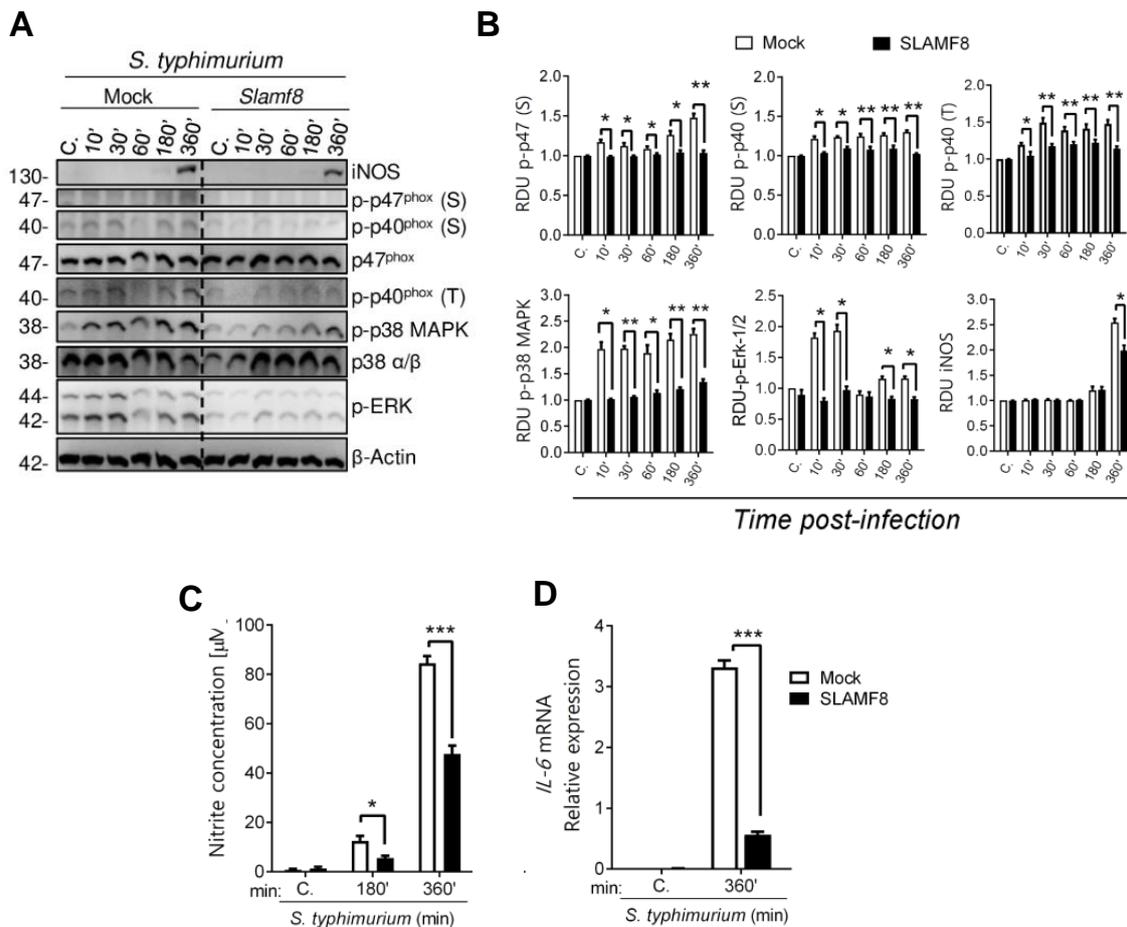


Figura 62. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en la activación de los mecanismos microbicidas, las vías p38 y ERK1/2 MAPK, y expresión de *il-6*, bajo la infección con *S. typhimurium*. (A) Imágenes representativas de *Western blots* de RAW264.7 que sobreexpresan SLAMF8 o no (*Mock*), infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10) a diferentes tiempos de post-infección. **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de fosforilación relativa fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). **(C)** Representación gráfica de la producción de NO [µM] a diferentes tiempos de post-infección. Determinación realizada mediante la reacción de Griess. **(D)** Representación gráfica de la expresión del ARNm de *il-6* mediante RT-qPCR en RAW264.7 que sobreexpresan SLAMF8 o no (*Mock*), infectados con *S. typhimurium* (m.o.i. 10). La expresión génica fue normalizada al nivel basal del correspondiente control. Los datos fueron analizados por medio del método $2^{-\Delta\Delta ct}$ usando la expresión de *HPRT1* como gen de referencia. Los valores indican la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. C, control; S, serina; T, treonina.

Dado que los resultados anteriores indicaron que en ausencia de SLAMF8 los pMφ infectados con *Salmonella* producían una mayor expresión de *il-6*, evaluamos finalmente el efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 sobre esta citoquina. Al analizar los resultados se observó que, las células que sobreexpresaban SLAMF8 generaron una expresión significativamente menor de *il-6* a las 6 h. de post-infección, en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8 (Fig. 62D).

De acuerdo con los resultados, se confirma que SLAMF8 es capaz de regular negativamente la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS, las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK, y la expresión de *il-6*, en Mφ de ratón infectados con *Salmonella typhimurium* *in vitro*.

En conclusión, los resultados obtenidos confirman que la expresión de SLAMF8 regula negativamente procesos de activación en Mφ murinos *in vitro*, bajo la estimulación con PMA, LPS puro y en el modelo de infección con *Salmonella typhimurium*.

Debido a su papel regulador sobre los mecanismos microbicidas bajo la infección con *Salmonella in vitro*, el siguiente objetivo planteado, fue analizar el papel de SLAMF8 en la capacidad de eliminación de este microorganismo *in vivo*.

7. Estudio de la implicación de SLAMF8 en la capacidad de eliminación de

S. typhimurium in vivo

En los experimentos de infección con *S. typhimurium in vitro* se observó que los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una mayor activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS en comparación con los pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+}. En base a estos resultados el siguiente punto que planteamos, fue estudiar el papel de SLAMF8 en la capacidad de eliminación de *S. typhimurium in vivo*, empleando ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo con el modelo de sepsis basado en inyección intraperitoneal (i. p.)³⁹⁹ de *S. typhimurium* en ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}. Este modelo consiste en la administración de la misma cantidad de dos cepas de *Salmonella*: cepa salvaje *S. typhimurium* empleada en todos los experimentos anteriores y una cepa atenuada *S. typhimurium* SseB⁻⁴⁰⁰, resistente a ampicilina. La cepa salvaje no puede ser eliminada por los ratones⁴⁰¹ y es usada como control de la infección, mientras que la cepa atenuada determina la capacidad microbicida^{401,402}.

En un estudio previo del laboratorio³⁴², se observó que los ratones SLAMF8^{-/-} presentaron un menor número de unidades formadoras de colonias (UFCs) para ambas cepas en comparación con los ratones SLAMF8^{+/+} al analizar homogeneizados procedentes de hígado y bazo a las 24 h. de la infección. Estos resultados indicaron que los ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una mayor capacidad microbicida que los ratones SLAMF8^{+/+}.

Con el fin de confirmar estos resultados y analizar la capacidad más allá de 24 h. de infección, los experimentos fueron repetidos y los ratones fueron mantenidos durante 48 h. Pasado este tiempo, los ratones fueron sacrificados y la capacidad microbicida fue determinada por medio del recuento de UFCs a partir de homogeneizados de bazos. Para controlar el curso del modelo de sepsis los ratones fueron pesados previa i. p., y a las 24 y 48 h. de la infección.

Al analizar los resultados, se observó que los ratones SLAMF8^{-/-} presentaron un número significativamente menor de UFCs obtenidas en bazo, en comparación con los ratones SLAMF8^{+/+}, tanto de la cepa salvaje como de la atenuada (**Fig. 63A**). Estos resultados indican una mayor capacidad microbicida en los ratones SLAMF8^{-/-} que en los SLAMF8^{+/+}.

Hay que resaltar de estos resultados, la diferencia significativamente menor de UFCs de la cepa salvaje obtenida en los ratones SLAMF8^{-/-} en comparación con SLAMF8^{+/+} (**Fig. 63A**), indicativa

de la pérdida de capacidad replicativa de *S. typhimurium* en los ratones SLAMF8^{-/-}. No existieron diferencias significativas de pérdida de peso entre los ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} (Fig. 63B).

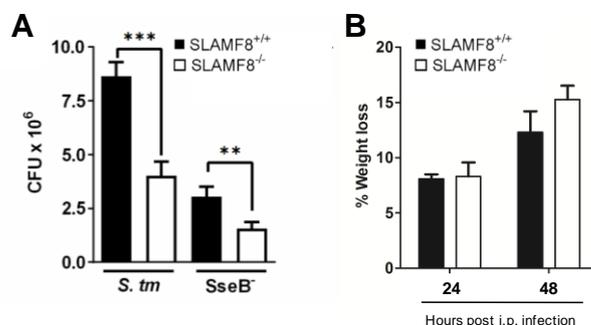


Figura 63. Análisis de la capacidad microbicida *in vivo* de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium*. (A) UFCs procedentes de homogeneizados de bazo de ratones infectados. Los ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} fueron inyectados i. p. con una mezcla de la cepa salvaje de *S. typhimurium* (*S. tm*) y atenuada (*SseB*⁻) (5·10⁴ bacterias), mantenidos durante 48 h. y sacrificados para determinar la capacidad microbicida por medio del recuento de UFCs procedentes de homogeneizados de bazos sembrados en placas de LB con y sin ampicilina (100 ng/ml). Los valores indican la media ± error estándar de 3 réplicas, de un experimento de 3 independientes. **p<0.01; ***p<0.001. (B) Representación gráfica del porcentaje de pérdida de peso de los ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} empleados en la determinación de la capacidad microbicida *in vivo*. Los valores indican la media ± error estándar obtenido en un experimento de 3 independientes (n=5 ratones empleados por grupo y experimento).

Estos resultados confirman los hallazgos previamente obtenidos en el laboratorio³⁴², en los que se observó que los ratones SLAMF8^{-/-} presentaban una mayor capacidad de eliminación de *Salmonella*.

Hay que resaltar de los resultados mostrados, que al obtener un menor número significativo de UFCs de la cepa salvaje en bazo, se pone de manifiesto que la ausencia de SLAMF8 afecta a la capacidad de replicación de *S. typhimurium*^{381,402}, y por tanto a la progresión del SCV.

Una vez confirmado que los ratones SLAMF8^{-/-} presentan una mayor capacidad de eliminación de *S. typhimurium in vivo*, faltaría elucidar sobre que mecanismo molecular podría estar regulando SLAMF8.

Estudios previos han mostrado que el NO producido por iNOS es un potente agente antimicrobiano en modelos de salmonelosis murinos⁴⁰³ y dado que en los ensayos aquí mostrados se ha detectado una mayor inducción de iNOS y producción de NO en pMφ SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium in vitro*, analizamos si los ratones deficientes en SLAMF8 podrían tener una mayor capacidad microbicida *in vivo*, debido a una mayor inducción de iNOS.

Para analizar la función de SLAMF8 sobre la regulación de iNOS *in vivo*, se inyectaron i. p. ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} con *S. typhimurium* y se realizó un análisis de la inducción de iNOS mediante *Western blot* en la población peritoneal y bazo.

Al analizar los resultados, se observó que los ratones SLAMF8^{-/-} presentaron una cantidad significativamente mayor de iNOS, tanto en la población peritoneal como en el bazo, en comparación con los ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 64A, B).

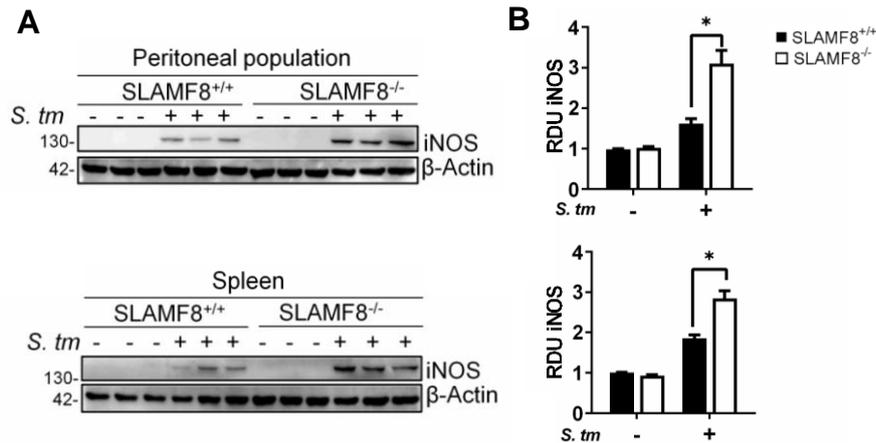


Figura 64. Análisis de la inducción de iNOS en ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} infectados con *S. typhimurium*. (A) Imágenes representativas de *Western blots* de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} inyectados o no i. p. con *S. typhimurium* (*S. tm*) ($5 \cdot 10^4$ bacterias). La inducción de iNOS fue analizada en lisados de la población peritoneal recogida y homogeneizado de bazos de los ratones sacrificados a las 48 h. de infección. (B) Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de las proteínas indicadas en A. Los niveles de expresión fueron normalizados con el control de carga apropiado y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media \pm error estándar obtenido en un experimento de 2 independientes (n=3 ratones empleados por grupo y experimento). *p<0.05.

De acuerdo con los resultados obtenidos, SLAMF8 es capaz de regular negativamente la inducción del mecanismo microbicida mediado por iNOS, implicado en la eliminación de *S. typhimurium in vivo*.

8. Estudio de la función de SLAMF8 en macrófagos humanos

Los resultados anteriores han mostrado el papel regulador negativo de SLAMF8 en distintos procesos microbicidas y de activación en M ϕ de ratón *in vitro*. Dado que el porcentaje de similitud del SLAMF8 murino y humano es del 75%²⁶⁸, era lógico pensar que la función observada en los M ϕ de ratón podría ser reproducible en M ϕ humanos.

Al igual que ocurre en ratón, estudios previos han mostrado que la expresión de SLAMF8 en M ϕ humanos se ve aumentada bajo la estimulación con IFN γ ²⁶⁸, pero sus funciones en humano, están aún por determinar.

Con el fin de estudiar su posible papel en humano, en primer lugar, analizamos el efecto de su sobreexpresión en la activación de NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK. En segundo lugar, examinamos la expresión de SLAMF8 en los subtipos de M ϕ M1 y M2, con objeto de ver la existencia de diferencia de expresión en perfiles pro- y anti-inflamatorios.

8.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de SLAMF8 en monocitos humanos sobre la activación de NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK

Para la realización de estos experimentos se empleó la línea tumoral monocítica humana THP-1³⁴⁴. Esta línea celular fue transfectada transitoriamente mediante electroporación con un vector de sobreexpresión que contenía la secuencia codificante para el *full length* de SLAMF8 humano.

El momento de uso de las células transfectadas transitoriamente con SLAMF8 se estableció a las 48 h. de la transfección. Este momento fue determinado por medio del análisis de la expresión de SLAMF8 mediante citometría de flujo a diferentes tiempos de post-transfección, detectando a este tiempo el mayor nivel de expresión. Los detalles referentes al procedimiento de transfección y chequeo se encuentran recogidos en el correspondiente punto de materiales y métodos de esta tesis doctoral.

Pasadas 48 h. de la transfección, las células fueron sometidas a la estimulación *in vitro* con LPS puro y PMA para analizar la activación de NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK (**Fig. 65A, B**).

Bajo la estimulación con LPS puro, la sobreexpresión de SLAMF8 condujo a una leve disminución en la fosforilación de los residuos de Ser en las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox} a los 5 y 15 min., en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8 (*Mock*). También se detectó una reducción significativa en la fosforilación de p38 MAPK, a los

8.2. Estudio de la expresión de SLAMF8 en los subtipos de macrófagos M1 y M2

Los M ϕ son células centinela provenientes de la diferenciación de monocitos que además de ejercer una función clave como primera línea de defensa en la eliminación de microorganismos, pueden ejecutar funciones moduladoras en la homeostasis celular. Esta plasticidad de funciones asociada a los M ϕ se debe a la capacidad que tienen estas células en diferenciarse a diferentes tipos, en base del estímulo recibido²¹.

La expresión de SLAMF8 es inducida mediante estímulos de bacterias Gram negativas, positivas e IFN γ en M ϕ ²¹⁸, por lo que puede considerarse como un regulador negativo de las respuestas inflamatorias ante estímulos asociados a procesos inflamatorios en M ϕ del subtipo M1, pero su posible función en un contexto antiinflamatorio inducido por el subtipo M2, aún no ha sido determinada. Por este motivo, nos planteamos analizar la expresión de SLAMF8 en un modelo de diferenciación *in vitro* de monocitos a los subtipos de M ϕ M1 y M2.

Para ello, se empleó el modelo optimizado y descrito por Morón-Calvente *et al.* (2018)³⁴⁷. Este modelo está basado en la diferenciación *in vitro* de la línea celular monocítica humana THP-1 a los subtipos de M ϕ M1 y M2. El modelo consiste, primeramente, en una diferenciación de esta línea celular a un subtipo de M ϕ denominado M0 o neutral, por medio del tratamiento con PMA (10 ng/ml) durante 24 h. A continuación, estas células son tratadas durante 48 h. bien con IFN γ (20 ng/ml) y LPS (100 ng/ml) para su polarización hacia M1, o con IL-4 (20 ng/ml) para hacerlo hacia el subtipo M2.

Con el fin de comprobar que el fenotipo de diferenciación obtenido fue el correcto, las células fueron evaluadas primeramente a nivel morfológico mediante microscopía óptica (**Fig. 66**). El análisis morfológico mostró que las células THP-1 no tratadas, presentaban el aspecto típico de esta línea celular, redondeadas y sin características adherentes. Las células diferenciadas a los subtipos M0, M1 y M2, adquirían adherencia a la superficie de la placa de cultivo, mostrando el subtipo M1 una forma ameboide y plana, y el subtipo M2 un aspecto fusiforme, presentando ambos subtipos lamelipodios y filopodios⁴⁰⁴.

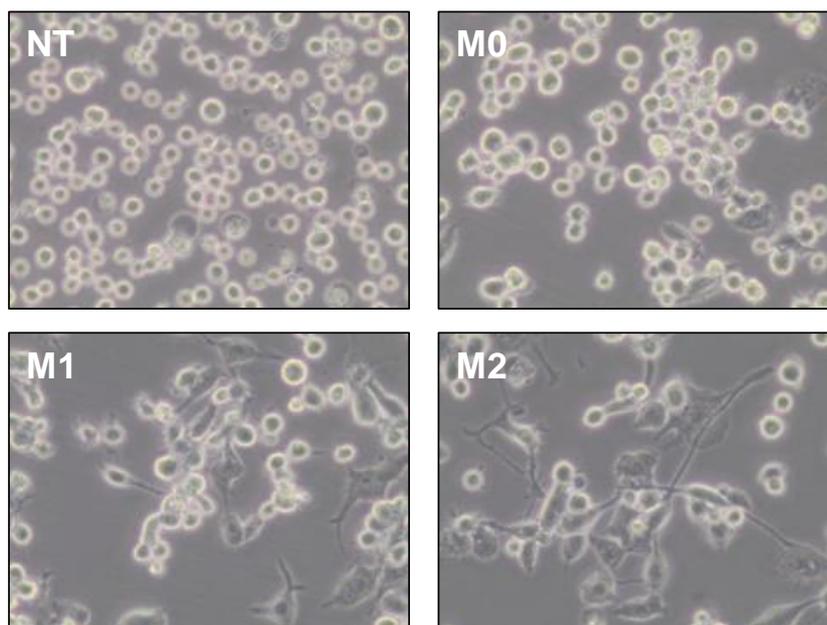


Figura 66. Análisis morfológico mediante microscopía óptica de la línea celular THP-1 diferenciada *in vitro* hacia los diferentes subtipos de Mφ. Las células no tratadas (NT) presentan un aspecto redondeado y sin características adherentes. El tratamiento con PMA (10 ng/ml) durante 24 h. para generar inicialmente el subtipo M0, hace que estas células adquieran características de adherencia. El tratamiento posterior con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 48 h. para polarizar hacia M1 provoca que las células presenten principalmente un aspecto ameboide. El tratamiento con IL-4 (20 ng/ml) durante 48 h. para la polarización hacia M2, genera una morfología fusiforme en estas células. Magnificación original 20x.

A continuación, para confirmar la diferenciación de los diferentes subtipos de Mφ se evaluó el patrón de expresión de marcadores mediante RT-PCR y *Western blot* (Fig. 67). De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos de RT-PCR (Fig. 67A, B), la diferenciación de monocito a cualquiera de los subtipos, generó un aumento de expresión de *cd14*⁴⁰⁵. La polarización hacia el fenotipo M1 mostró una mayor expresión de *cxcl10*, mientras que el fenotipo M2 presentó una mayor expresión de *ccl18* y exclusivamente de *cd206*⁴⁰⁶, además mediante *Western blot* (Fig. 67C, D) se detectó la expresión de E-cadherina que es típica del subtipo M2^{407,408}.

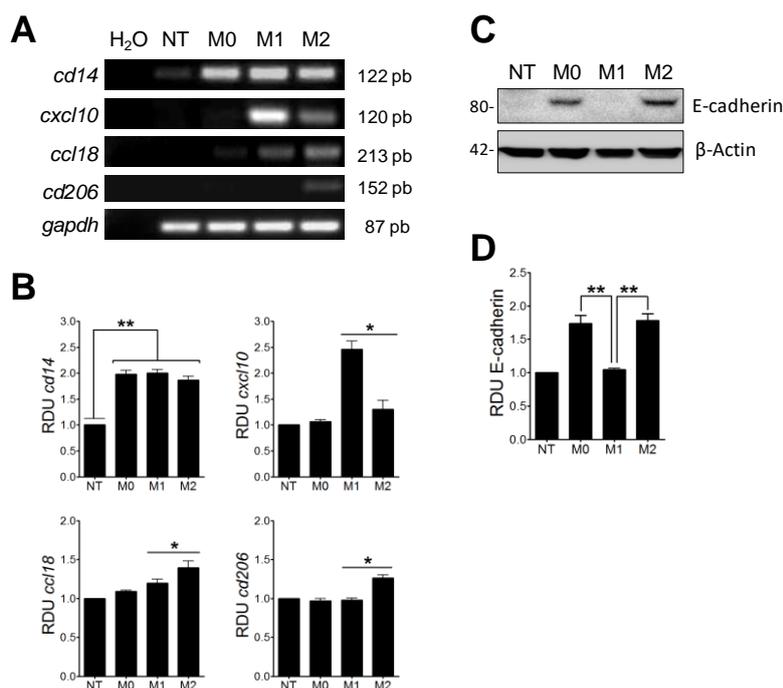


Figura 67. Análisis del patrón de expresión de marcadores de los distintos subtipos de Mφ, mediante RT-PCR y Western blot. (A) Imágenes representativas de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV, empleado para la determinación del ARNm de los diferentes marcadores de diferenciación. **(B)** Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los genes indicados en A. Los niveles de expresión fueron normalizados empleando como control de carga la expresión de *gapdh* y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **(C)** Imagen representativa de Western blot empleado para el análisis de los subtipos de Mφ por medio del análisis de la expresión del marcador E-cadherina. **(D)** Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de E-cadherina. Los niveles de expresión fueron normalizados empleando como control de carga la expresión de β-actina y representados como RDU. Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$. NT, no tratadas.

Una vez confirmado que el modelo de diferenciación generó los diferentes subtipos de Mφ, se evaluó la expresión de SLAMF8 mediante RT-PCR y citometría de flujo (Fig. 68). En el estado monocítico no se detectó expresión del ARNm de *Slamf8* mediante RT-PCR, mientras que sí se detectó cuando estas células fueron diferenciadas a los subtipos M0, M1 y M2 (Fig. 68A, B). La expresión de *Slamf8* entre los subtipos M0, M1 y M2 mediante RT-PCR no fue significativa, aunque se observó un ligero aumento de expresión de los subtipos M1 y M2 frente al M0. Además, el subtipo M2 presentó una ligera mayor expresión de *Slamf8* al ser comparado con el M0.

Al analizar los resultados de citometría de flujo (Fig. 68C, D), no se detectó expresión de SLAMF8 en las células en estado monocítico. Si se detectó cuando las células fueron diferenciadas a cualquiera de los subtipos, resultado concordante con el nivel de expresión de *Slamf8* detectado mediante RT-PCR. El mayor nivel de expresión de SLAMF8 fue detectado en

el subtipo M1, siendo su expresión significativamente mayor al ser comparada con la del subtipo M0 y M2. Al comparar los niveles de expresión de SLAMF8 entre los subtipos M0 y M2, no se encontraron diferencias significativas, aunque en el subtipo M2 se detectó un leve aumento al compararlo con el M0, resultado concordante con el nivel de expresión de *Slamf8* detectado mediante RT-PCR entre estos subtipos comentado anteriormente.

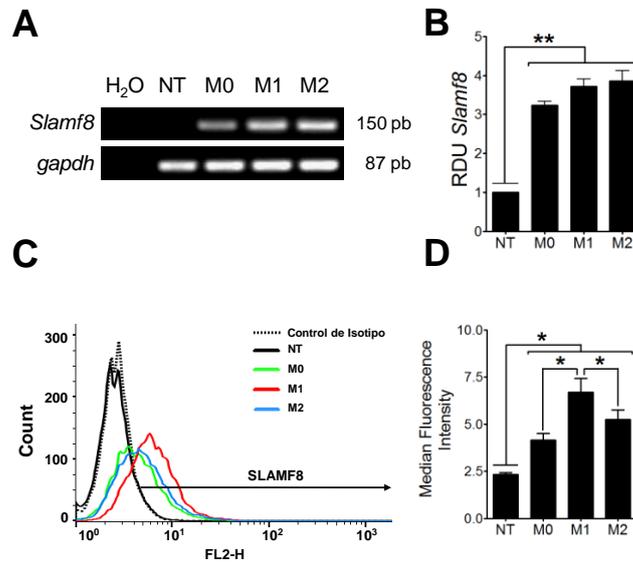


Figura 68. Análisis de la expresión de SLAMF8 en los distintos subtipos de Mφ, mediante RT-PCR y citometría de flujo. (A) Imágenes representativas de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV, empleado para la determinación del ARNm de *Slamf8*. (B) Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de *Slamf8* mostrada en A. Los niveles de expresión fueron normalizados empleando como control de carga la expresión de *gapdh* y representados como unidades de densitometría relativa (RDU). Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. **p<0.01. (C) Imagen representativa de un histograma de citometría de flujo empleado para el análisis de la expresión de SLAMF8 en los distintos subtipos de Mφ. (D) Representación gráfica de los niveles de expresión de SLAMF8 determinada como la mediana de la intensidad de fluorescencia. Los valores indican la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05. NT, no tratadas.

Estos resultados muestran que SLAMF8 se encuentra expresado de manera diferencial en Mφ del subtipo M1 y M2, por lo que podría tener un papel en la regulación de los procesos pro- y anti-inflamatorios en los diferentes subtipos.

DISCUSIÓN

El trabajo presentado en esta tesis doctoral consiste en un análisis en profundidad del papel de SLAMF8 en la funcionalidad de los Mφ. Para ello, se han usado cultivos primarios de pMφ provenientes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} inyectados con TGC. Esta metodología es ampliamente utilizada para realizar estudios funcionales con este tipo celular, y permite la obtención de gran número de Mφ para abordar la parte experimental³⁶³. Debemos señalar que los pMφ presentan el mismo fenotipo que los Mφ derivados de médula ósea²¹⁸.

Gracias a los resultados obtenidos y discutidos a continuación, se concluye que SLAMF8 actúa como regulador negativo de los procesos de activación *in vitro*, a través de su acción sobre la PI3K en el bucle de retroalimentación de la PKC y PI3K. Además, mostramos como SLAMF8 es capaz de regular negativamente mecanismos microbicidas tanto *in vitro* como *in vivo*, y que su función en Mφ humanos puede ser similar a la encontrada en Mφ de ratón.

Finalmente se discute la posibilidad de su uso como diana terapéutica en humano, bien en el tratamiento de estados inflamatorios severos o no resueltos, o en el tratamiento de algunos tipos de cáncer para los cuáles se ha establecido una asociación. En ambos casos, se realiza una aproximación de las posibles estrategias terapéuticas en base a lo previamente descrito.

1. SLAMF8 como regulador negativo de las vías de activación y ensamblaje de NOX2 en pMφ de ratón

La activación completa de NOX2 requiere de la fosforilación de las subunidades citosólicas y de membrana, activación de Rac-GTPasas y ensamblaje de las subunidades en la membrana⁸⁷. Teniendo en cuenta los estudios previos que demostraban que SLAMF8 regula de manera negativa la actividad NOX2 en Mφ a través de la PKC³⁴², y dada la participación de las vías p38, ERK1/2 MAPK^{125,129,145} y PI3K¹³¹⁻¹³³ en la activación de NOX2, se analizó en profundidad el papel de SLAMF8 sobre las diferentes vías de activación de NOX2 en pMφ procedentes de ratones SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}.

Mediante la estimulación con PMA, se realizó un análisis de la activación de NOX2 a través de la vía PKC, y con LPS puro se analizó su activación a través de la vía PI3K^{132,353,354}.

1.1. Función moduladora de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 a través de vías directas e indirectas de la PKC. Papel regulador negativo de SLAMF8 sobre la PI3K

La estimulación con PMA y LPS puro confirmaron que la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p40^{phox} (Fig. 44A, B), y las vías de activación p38³⁴² y ERK1/2 MAPK (Fig. 44C, D) era mayor en ausencia de SLAMF8. Además, estos resultados son indicativos de que SLAMF8 es capaz de modular negativamente la activación de NOX2 de manera directa e indirecta de PKC en Mφ.

Es importante indicar que la fosforilación de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} en Ser sólo fue detectada bajo la estimulación con PMA (Fig. 44A, B). En base a nuestra experiencia y por las condiciones utilizadas de baja concentración de FBS (0,5%) y tiempos de análisis, la fosforilación en Ser de estas subunidades es difícil de detectar con LPS puro, por lo que empleamos la fosforilación en Thr 154 de la subunidad p40^{phox} como marcador de activación de NOX2, ya que esta es crítica en el reclutamiento de la subunidad p47^{phox} al fagosoma⁸⁷. Hay que destacar que, la estimulación de células innatas solo con LPS *in vitro* se considera un proceso de iniciación o *priming* de activación, al no ir acompañado de otros estímulos⁸⁷.

El fenotipo observado en pMφ se confirmó por medio de la sobreexpresión del SLAMF8 murino en la línea celular RAW264.7. Estos resultados demostraron la función reguladora negativa de SLAMF8 en la activación de pMφ de ratón. La estimulación con PMA (Fig. 60A, B) y LPS puro (Fig. 61A, B), generó en las células que sobreexpresaban SLAMF8 un fenotipo de activación contrario al obtenido en los pMφ SLAMF8^{-/-}, ya que la sobreexpresión de SLAMF8 hizo que los niveles de fosforilación en las subunidades citosólicas de la NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK fueran menores que los obtenidos en las células control.

El empleo de inhibidores específicos nos permitió un análisis más profundo y definió el efecto de SLAMF8 en las vías implicadas en la activación de NOX2.

El pretratamiento con el inhibidor de la PKC en la estimulación con PMA, condujo a una inhibición total en la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ (Fig. 45), una ausencia de fosforilación de las subunidades citosólicas, y reducción de la activación de p38 y ERK1/2 MAPK en ambos tipos de pMφ (Fig. 46A, B). Estos resultados están en concordancia con la amplia capacidad de este inhibidor sobre la PKC⁴⁰⁹ y la dependencia de activación de otras vías a través de la potente activación de esta quinasa con PMA. El pretratamiento con el inhibidor de p38 MAPK redujo la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ aunque se mantenían las diferencias entre ambos tipos de muestras, lo que demuestra que SLAMF8 es capaz de regular de manera negativa e independiente de esta vía la

producción de $\cdot\text{O}_2^-$ (Fig. 45), la fosforilación de las subunidades p47^{phox} en Ser y p40^{phox} en Thr 154, y las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK (Fig. 46A, B). No obstante, debemos resaltar que la modulación por SLAMF8 afecta a la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Ser a través de p38 MAPK, ya que los niveles de fosforilación para esta subunidad citosólica se igualaron en ambos tipos de pMφ bajo este inhibidor (Fig. 46A, B).

Hay que destacar en estos resultados que, la activación en p40^{phox} dependiente de p38 MAPK no ha sido demostrada previamente. Podría deberse a una fosforilación directa sobre esta subunidad, o bien que este resultado pueda ser debido indirectamente a la acción de p38 MAPK sobre otras vías. Es importante indicar además, que la reducción en la fosforilación de p38 MAPK detectada en ambos tipos de pMφ bajo este inhibidor (Fig. 46A, B) confirmó la capacidad previamente descrita de autofosforilación presentada por esta quinasa⁴¹⁰.

Lo que más nos sorprendió en los resultados fue al emplear el inhibidor de la PI3K. El pretratamiento con este inhibidor condujo a una reducción de $\cdot\text{O}_2^-$ a niveles basales, e igualándose en ambos tipos de pMφ (Fig. 45). En concordancia, la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox}, y las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK se redujeron, no existiendo diferencias entre ambos tipos de pMφ (Fig. 46A, B).

La inhibición de PI3K evitaría la generación de fosfatidilinositoles encargados de la interacción con los dominios PX de p47^{phox} y de p40^{phox}¹⁷⁶, por lo que el ensamblaje de NOX2 estaría comprometido, explicando así la reducción de $\cdot\text{O}_2^-$ detectada. Además, estos resultados indican la participación activa de la PI3K y la PKC en la activación de NOX2, y que SLAMF8 es capaz de modular significativamente de manera negativa la interacción entre ambas vías a través de su acción sobre la PI3K.

La interacción entre la PKC y PI3K ha sido previamente descrita y de acuerdo con los resultados obtenidos, creemos que la modulación de SLAMF8 interviene en el bucle de retroalimentación positivo entre la PI3K y la PKC. La PI3K puede ser activada por la PKC a través de la fosforilación de MARCKS (*Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*)⁴¹¹, que por medio de la liberación de PtdIns(4,5)P₂, activarían a PI3K⁴¹². A continuación la PI3K activaría a AKT, la cual tiene la capacidad de fosforilar los residuos en Ser 304 y 328 localizados en la región de autoinhibición de p47^{phox}¹⁴⁸, por lo que al inhibir la PI3K se reducen los niveles de fosforilación de esta subunidad. No existen evidencias previas de que la PI3K actúe directamente en la fosforilación de la subunidad p40^{phox}, por lo que la reducción detectada en la fosforilación de los residuos de Ser y Thr 154 en esta subunidad, indicaría otra vía de activación inducida por la PI3K. Esta vía puede ser la mediada por la PI3K a través de la quinasa PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent*

protein Kinase-1). La activación de la PDK1 se realiza a través del $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ producido por la PI3K y una vez activa, además de tener la capacidad de activar a AKT^{413} , es capaz de activar la $\text{PKC}^{414,415}$. Esto explicaría cómo la PI3K es capaz de mediar en la fosforilación en Ser y Thr 154 de la subunidad p40^{phox} .

La reducción en los niveles de fosforilación en MAPK en ambos tipos de $\text{pM}\phi$ al emplear el inhibidor de la PI3K junto a la estimulación con PMA puede explicarse por varios mecanismos, como se muestra en el esquema general de la **figura 69**. Uno de ellos puede ser por la participación directa de la PI3K sobre la activación de MAPK^{416} , y otro por la activación de MAPK a través de la vía $\text{PI3K-PDK1-PKC}^{414,415}$ (**Fig. 69**). Este último reforzaría la idea de que SLAMF8 ejerce su efecto regulador negativo sobre el bucle de retroalimentación positivo entre la PI3K y la PKC.

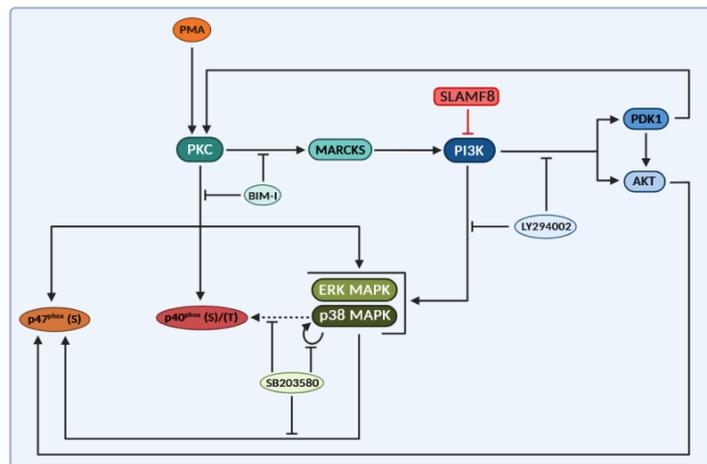


Figura 69. Mecanismo de regulación de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 a través de la vía directa mediada por PKC. Esquema general de las vías de activación implicadas en la activación de NOX2 a través de PMA y cómo SLAMF8 podría actuar regulando negativamente a través de la PI3K. El PMA activaría a PKC, la cual provocaría la fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} , p40^{phox} de NOX2, y las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK de manera directa. Las MAPK fosforilarían a la subunidad citosólica p47^{phox} , no existiendo evidencias de su acción sobre la subunidad p40^{phox} . La PKC a través de su acción sobre MARCKS, activaría a PI3K y esta a su vez a la vía MAPK, a AKT que fosforilaría la subunidad citosólica p47^{phox} , y a PDK1 que por su acción sobre PKC, actuaría a modo de bucle de retroalimentación positivo. Además, PDK1 tendría la capacidad de activar a AKT, promoviendo la fosforilación de la subunidad citosólica p47^{phox} . SLAMF8 ejercería su efecto regulador negativo sobre la PI3K. Bajo el inhibidor de la PI3K, no se encuentran diferencias en la activación de NOX2, ni en la fosforilación de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK, al comparar los $\text{pM}\phi$ en presencia o ausencia de SLAMF8. S, serina; T, treonina; BIM-I, Bis-Indol-Maleimida I.

En cuanto a la estimulación con LPS puro, ésta permitió analizar la activación de la vía $\text{PI3K}^{132,353,354}$ a través de la vía canónica de activación mediada por el TLR4. La unión del LPS puro con el TLR4 provoca la activación de la cascada de señalización mediada por TIRAP/MyD88-TRAF6-TAK1, que induce a la activación directa de PI3K y de las $\text{MAPK}^{41,42}$. Además, por medio del análisis de la transducción de señales en los $\text{pM}\phi$ $\text{SLAMF8}^{+/+}$ y

SLAMF8^{-/-} expuestos previamente a los inhibidores, se confirmó el papel regulador negativo de SLAMF8 sobre la PI3K y de la acción de ésta en la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK. Así pues, el pretratamiento con el inhibidor de la PKC condujo a la reducción total de fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154 en ambos tipos de pMφ (**Fig. 47A, B**). Este resultado indicó la implicación de la PKC sobre la fosforilación de la subunidad citosólica p40^{phox} 417.

Al analizar la fosforilación de p38 MAPK bajo el efecto del inhibidor de la PKC, se observó que en ambos tipos de pMφ los niveles se reducían, pero aún con esta reducción, los niveles seguían siendo significativamente mayores en pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 47A, B**). Este resultado pondría de manifiesto, un leve efecto de la PKC sobre la fosforilación de p38 MAPK⁴¹⁰. Para el caso de ERK1/2 MAPK, su fosforilación a nivel general no se redujo en comparación con los pMφ no tratados con este inhibidor, y las diferencias también seguían siendo significativamente mayores en pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} (**Fig. 47A, B**). Estos resultados indican que SLAMF8 es capaz de regular de manera negativa e independiente de la PKC la fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK, bajo la estimulación con LPS puro, posiblemente por la participación de la vía PI3K sobre éstas⁴¹⁶.

El pretratamiento con el inhibidor de p38 MAPK en los estímulos con LPS, seguía manteniendo las diferencias significativamente mayores de fosforilación de p40^{phox} en Thr 154, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+}, y solamente se detectó una reducción significativamente menor a los 5 min. en los pMφ SLAMF8^{-/-} pretratados con este inhibidor, en comparación con los controles para todas las proteínas analizadas (**Fig. 47A, B**). Este resultado es indicativo de que SLAMF8 afecta a la vía p38 MAPK, la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK a tiempos tempranos de estimulación con LPS puro. El hecho de no detectar una reducción en los niveles de fosforilación de p38 MAPK en ambos tipos de pMφ bajo el pretratamiento con este inhibidor, al compararlos con los controles, indicarían que bajo el estímulo con LPS puro, o al menos bajo las condiciones empleadas, no se detecta acción de autofosforilación de p38 MAPK⁴¹⁰ (**Fig. 47A, B**).

La confirmación de que SLAMF8 actúa como un regulador negativo a través de la vía PI3K sobre la activación de NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK, se obtuvo al analizar los resultados del pretratamiento con el inhibidor de la PI3K (**Fig. 47A, B**). Según éstos, los niveles de fosforilación de p40^{phox} en Thr 154 se redujeron a los niveles basales en ambos tipos de pMφ,

indicativo de la dependencia de fosforilación de esta subunidad citosólica a través de la vía PI3K, y de que SLAMF8 sería capaz de regular negativamente sobre esta vía.

Al analizar los niveles de fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK, las diferencias existentes entre ambos tipos de pMφ desaparecieron, lo que indicaría que SLAMF8 también actuaría como regulador negativo de la fosforilación de las MAPK a través de la vía PI3K.

Nuevamente, el posible mecanismo que explicaría estos resultados bajo la estimulación con LPS puro, sería la acción reguladora negativa de SLAMF8 sobre el bucle de retroalimentación positivo PI3K-PKC, mediado por PDK1⁴¹⁸.

Es importante mencionar que, aunque la fosforilación de las vías p38 y ERK1/2 MAPK se vieron reducidas con el uso del inhibidor de la PI3K, éstas continuaban fosforiladas. Esto es indicativo de la acción de la cascada de señalización mediada por TIRAP/MyD88-TRAF6-TAK1 sobre ellas, inducida por el LPS puro al unirse con el TLR4^{41,42}. A continuación, se muestra un esquema general (**Fig. 70**) de las vías de activación implicadas en la activación de NOX2 a través del LPS puro y cómo SLAMF8 podría actuar regulando negativamente a través de la PI3K.

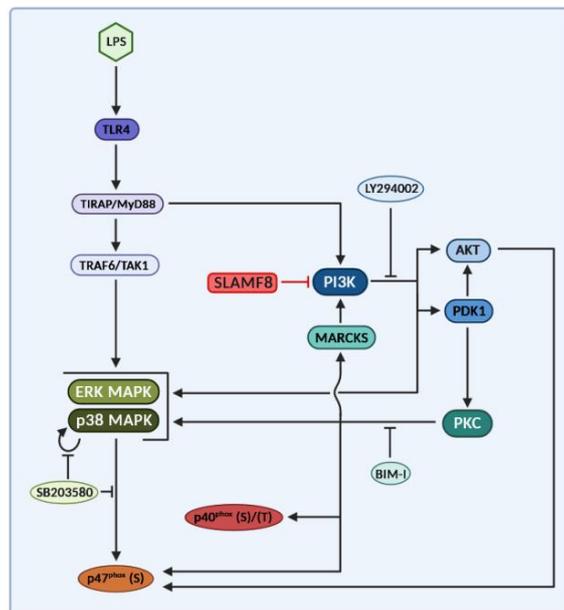


Figura 70. Mecanismo de regulación de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 a través de vías indirectas de la PKC.

Esquema general de las vías de activación implicadas en la activación a través del LPS. El LPS puro activaría a MAPK a través de la cascada de señalización TIRAP/MyD88-TRAF6-TAK1. Las MAPK activas fosforilarían a la subunidad citosólica p47^{phox} de NOX2. La PI3K sería activada por medio del LPS puro también a través de la vía canónica de activación mediada por el TLR4. Una vez activa, la PI3K puede activar a MAPK, a AKT que fosforilaría la subunidad citosólica p47^{phox}, y a PDK1 que por su acción sobre PKC, actuaría a modo de bucle de retroalimentación positivo a través de MARCKS. Además, PDK1 tendría la capacidad de activar a AKT, promoviendo la fosforilación de la subunidad citosólica p47^{phox}. SLAMF8 ejercería su efecto regulador negativo sobre la PI3K. Bajo el inhibidor de la PI3K, no se encuentran diferencias en la activación de NOX2, ni en la fosforilación de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK, al comparar los pMφ en presencia o ausencia de SLAMF8. S, serina; T, treonina; BIM-I, Bis-Indol-Maleimida I.

En conjunto estos resultados confirman que SLAMF8 es capaz de modular negativamente la activación de NOX2 a través de su acción sobre el bucle de retroalimentación positivo entre la PI3K y la PKC, mediado por PDK1.

1.2. Función moduladora de SLAMF8 sobre la movilización de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana

Los resultados mostrados en esta tesis doctoral han confirmado que la ausencia de SLAMF8 provoca una mayor movilización de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} fosforiladas en Ser y de Rac-GTPasas a la membrana (Fig. 47A, B). Una mayor movilización de las subunidades p47^{phox} y p40^{phox} en sus formas fosforiladas y de Rac-GTPasas a la membrana de los pMφ SLAMF8^{-/-} se traduciría en un mayor ensamblaje de NOX2^{363,364}. Esta mayor movilización podría estar mediada también por la modulación negativa de SLAMF8 sobre la PI3K.

A continuación, se muestra un esquema general (Fig. 71) de cómo SLAMF8 podría actuar regulando negativamente a través de la PI3K la movilización de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox} y Rac-GTPasas a la membrana.

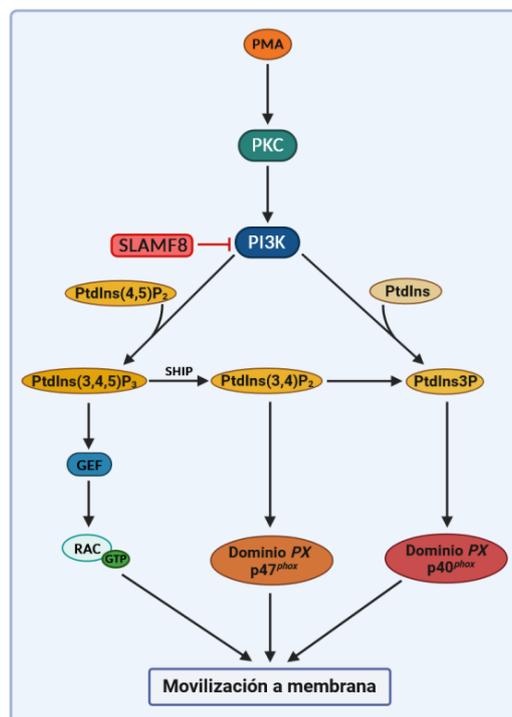


Figura 71. Posible mecanismo de regulación de SLAMF8 sobre la movilización de subunidades citosólicas de NOX2 a la membrana. El PMA activaría a PKC, que a su vez activaría a PI3K. La activación de PI3K, generaría fosfatidilinositoles que participan en la movilización de las subunidades citosólicas de NOX2 a membrana. SLAMF8 regularía negativamente la movilización de las subunidades citosólicas de NOX2 a través de su efecto sobre la PI3K. La ausencia de SLAMF8 genera una mayor movilización de las subunidades citosólicas p47^{phox}, p40^{phox} y de Rac-GTPasas a la membrana, posiblemente por una mayor acción de la PI3K.

Bajo la estimulación con PMA, la ausencia de SLAMF8 provocaría una mayor actividad de la PI3K, a través de la PKC. La mayor actividad de la PI3K en los pMφ SLAMF8^{-/-}, produciría una mayor cantidad de fosfatidilinositoles, que explicarían los resultados obtenidos. Por un lado, una mayor producción de PtdIns(3,4,5)P₃, induciría una mayor activación de las Rac-GTPasas, ya que este fosfatidilinositol actúa activando a GEF, provocando el intercambio de GDP por GTP, la disociación de RhoGDI y la consecuente movilización a la membrana de la forma activa de las Rac-GTPasas⁴¹⁹. Por otro lado, una mayor producción de los otros fosfatidilinositoles generados por la PI3K o por la acción de fosfatasas, actuarían favoreciendo la movilización de las subunidades citosólicas de la NOX2. La mayor movilización detectada de la subunidad p47^{phox}, podría estar promovida por una mayor producción de PtdIns(3,4)P₂, mientras que la de p40^{phox} lo estaría, por la de PtdIns3P¹⁷⁴.

2. Efecto de la acción de SLAMF8 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina en pMφ de ratón

La reorganización del citoesqueleto de actina, es un proceso que modula diferentes funciones del Mφ como pueden ser la migración al foco inflamatorio, fagocitosis, formación del fagosoma y presentación antigénica³⁶⁵.

Según los resultados obtenidos, los pMφ deficientes en SLAMF8 presentaron una mayor reorganización del citoesqueleto de actina (**Fig. 49A, B**). Pensamos que este resultado podría deberse nuevamente al papel regulador negativo de SLAMF8 sobre la PI3K a través de la PKC⁴¹², cómo se muestra en el esquema general de la **Figura 72**.

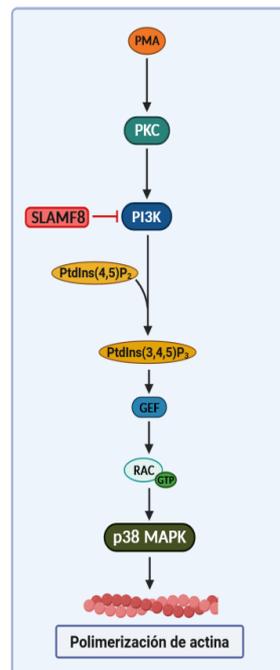


Figura 72. Mecanismo de regulación de SLAMF8 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina. Esquema general de cómo SLAMF8 podría actuar regulando negativamente a través de la PI3K la reorganización del citoesqueleto de actina. El PMA activaría a PKC, que a su vez activaría a PI3K. La PI3K generaría PtdIns(3,4,5)P₃ que activarían a Rac-GTPasas. Éstas por su acción sobre p38 MAPK, inducirían la polimerización de actina y por tanto la reorganización del citoesqueleto de actina. SLAMF8 regularía negativamente la polimerización de actina a través de su efecto sobre la PI3K. La ausencia de SLAMF8 genera una mayor polimerización de actina, posiblemente por una mayor acción de la PI3K.

La estimulación con PMA provocaría en los pMφ deficientes en SLAMF8 una mayor actividad de la PI3K a través de la PKC. Una mayor producción de PtdIns(3,4,5)P₃ por parte de la PI3K, generaría una mayor activación de las Rac-GTPasas⁴¹⁹, las cuales inducirían a su vez la polimerización de filamentos de actina⁴²⁰ por medio de la activación de la vía p38 MAPK a

través de PAK⁴²¹. Es importante recordar que bajo la estimulación con PMA se detecta una mayor activación de la vía p38 MAPK (Fig. 44C, D) y de Rac-GTPasas (Fig. 48A, B) en los pMφ SLAMF8^{-/-}, lo cual refuerza este posible mecanismo de acción de SLAMF8 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.

La mayor polimerización de actina detectada en los pMφ deficientes en SLAMF8, podría explicar los resultados obtenidos por Wang *et al.*, (2015). Éstos mostraron que SLAMF8 actuaba como regulador negativo de la migración de Mφ, neutrófilos y DC, al foco inflamatorio²¹⁹.

La migración de los Mφ al foco inflamatorio es un proceso clave en la defensa del hospedador frente a microorganismos. Este proceso está promovido por quimiotaxis, se encuentra regulado por la reorganización del citoesqueleto de actina⁴²² y también por el bucle de retroalimentación positivo entre la PI3K y la PKC^{412,423}. Debido a ello, es lógico pensar que la mayor migración de Mφ deficientes en SLAMF8 observada por Wang *et al.*, (2015)²¹⁹, podría explicarse por la mayor capacidad de reorganización del citoesqueleto de actina detectada en los pMφ SLAMF8^{-/-}, posiblemente inducida por la falta de control sobre la PI3K en los Mφ deficientes en SLAMF8.

El conjunto de resultados discutidos hasta ahora, ponen de manifiesto la capacidad de SLAMF8 de actuar como regulador negativo de la activación de NOX2 a través de la PI3K y también de la reorganización del citoesqueleto de actina. Esto implicaría un papel regulador en la activación de los Mφ. Ambos procesos son clave en la eliminación de microorganismos^{25,365}, por lo que decidimos estudiar el papel de SLAMF8 en la progresión de infecciones graves, empleando como ejemplo un proceso infeccioso producido por *Salmonella*.

3. Papel de SLAMF8 sobre los mecanismos microbicidas y de sus vías de activación, en un modelo de infección con *Salmonella in vitro*

Los resultados obtenidos con estímulos agonistas demostraban que SLAMF8 modula la capacidad microbicida y respuesta inflamatoria en M ϕ . Esto se confirmó con el análisis de la activación de NOX2 y actividad microbicida en el modelo de fiebre tifoidea en humanos por medio del uso de *S. typhimurium* en ratones³⁶⁹.

En primer lugar, comprobamos que el tratamiento con *S. typhimurium in vitro* incrementaba la expresión de *Slamf8* en pM ϕ SLAMF8^{+/+} pretratados o no con IFN γ (Fig. 50), al igual que ocurría en la estimulación con *E. coli*²¹⁸.

Los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS son clave en la eliminación de *Salmonella*. Éstos participan en diferentes estadios del desarrollo del SCV^{182,376,377} y a su vez pueden ser modificados por *Salmonella* a través de proteínas efectoras introducidas por el T3SS^{374,375}.

Para analizar si SLAMF8 tenía alguna función sobre los mecanismos NOX2 e iNOS bajo el modelo con infección con *S. typhimurium in vitro*, se analizó la activación de NOX2 y la inducción de iNOS mediante *Western blot*. Los resultados mostraron que, la ausencia de SLAMF8 producía una mayor fosforilación de las subunidades citosólicas p47^{phox} en Ser y de p40^{phox} en Thr 154, así como una mayor inducción de iNOS (Fig. 51A, B).

Bajo este modelo de infección, no detectamos fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Ser. Estudios previos del laboratorio si detectaron fosforilación de esta subunidad en Ser, bajo la infección con *E. coli*³⁴². Creemos que la ausencia de detección en nuestros ensayos fue debida a los tiempos y m.o.i empleados. En los estudios con *E. coli* el m.o.i. fue de 50, mientras que en nuestros ensayos lo fue de 10. Por otro lado, puede deberse a la capacidad de inhibición de NOX2 por parte de *Salmonella* evitando que, a estas dosis, se muestre la fosforilación de esta subunidad.

Como indicamos con anterioridad, la ausencia de SLAMF8 también generó una mayor inducción de iNOS y su detección fue más tardía que, la aparición de fosforilación en las subunidades citosólicas de NOX2. Esto nos indica que en el proceso de infección por *S. typhimurium* primeramente se produciría una activación de NOX2 durante el desarrollo del SCV intermedio, y más tarde la inducción y participación de iNOS en el SCV tardío. Esta separación temporal de activación de estos mecanismos ha sido previamente descrita por otros autores, los cuales han demostrado además, la importancia de ROS en la eliminación

inicial y de RNS en la eliminación tardía de *Salmonella*, bien por un efecto sinérgico con ROS o por sus propias características bacteriostáticas⁴²⁴.

La mayor inducción de iNOS detectada en los pMφ SLAMF8^{-/-} puede deberse a varios motivos. Uno de ellos puede ser por la posible acción moduladora de SLAMF8 sobre las vías de activación implicadas en la regulación transcripcional de la expresión de iNOS, como pueden ser las mediadas por PKC¹⁹¹, MAPK¹⁸⁴ y PI3K⁴²⁵. Otro motivo que no es excluyente del anterior, puede ser por la mayor producción de ROS generada en estos pMφ. Existen evidencias de que el H₂O₂, puede actuar como mensajero activando la vía NF-κB⁴²⁶, y dado que este factor de transcripción participa en la regulación transcripcional de la inducción de iNOS¹⁹¹, una mayor activación de NF-κB vía ROS, podría promover su expresión. Esta teoría estaría además en concordancia con estudios previos de nuestro laboratorio, en los que se detectó una mayor producción de ROS en pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+}, bajo la estimulación con *S. typhimurium*³⁴².

Los niveles de fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK en los estímulos con *Salmonella* confirmaron el efecto modulador de SLAMF8 sobre estas vías (**Fig. 51A, B**). Es importante indicar que las diferencias significativas de fosforilación se detectaron en todos los tiempos de post-infección analizados, lo que se puede traducir como una mayor activación de eventos celulares desarrollados durante el procesos de infección mediados por estas vías, como son la activación de NOX2^{125,129,130} y la inducción de iNOS¹⁸⁴.

La sobreexpresión del SLAMF8 murino en la línea celular RAW264.7, confirmó de nuevo la función reguladora negativa de SLAMF8 en la activación de pMφ, ahora bajo el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium*. Las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron un fenotipo contrario al obtenido en pMφ sin sobreexpresión, ya que se obtuvieron menores niveles de fosforilación en las subunidades citosólicas de la NOX2, y las vías p38 y ERK1/2 MAPK, una menor inducción de iNOS (**Fig. 62A, B**) y una consecuente menor producción de NO (**Fig. 62C**), en comparación con las células control.

Una vez determinada una mayor activación de los mecanismos microbicidas mediados por NOX2 e iNOS, y de las vías p38, ERK1/2 MAPK en los pMφ SLAMF8^{-/-}, el siguiente objetivo fue analizar a través de qué vía de activación modulaba SLAMF8 sobre estas proteínas en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*. Por medio de la exposición previa a los inhibidores anteriormente indicados, se confirmó que SLAMF8 actuaba como un regulador negativo a través de la PI3K.

3.1. Confirmación de SLAMF8 como regulador negativo a través de la PI3K en pMφ infectados con *S. typhimurium*

Los resultados mostraron de nuevo el efecto de SLAMF8 sobre la vía PI3K. Según los resultados, la ausencia de SLAMF8 se traducía en un aumento de la activación de NOX2 e iNOS, así como de p38 y ERK1/2 MAPK, a través de la vía PI3K. A continuación, se discuten los resultados obtenidos y las conclusiones derivadas del uso de cada inhibidor para las vías de activación analizadas.

El pretratamiento con el inhibidor de la PKC (**Fig. 52A, B**), constató la implicación directa de la PKC sobre la fosforilación de la subunidad p40^{phox} en Thr 154⁴¹⁷, ya que el resultado es similar al obtenido bajo la estimulación con PMA y LPS puro. Además, y al contrario que con los estímulos agonistas, la inhibición de la PKC no inhibió la activación del resto de proteínas analizadas aunque redujo sus niveles de activación. Esto es indicativo de la participación de otras vías de activación, además de ésta, en la fosforilación en Ser de la subunidad p47^{phox} y de las vías p38, ERK1/2 MAPK e inducción de iNOS, sugiriendo el papel de SLAMF8 como regulador negativo a través de una vía independiente de la PKC. Hay que tener en cuenta, que en estas estimulaciones otros receptores PAMPs estarían implicados.

En el pretratamiento con el inhibidor de p38 MAPK (**Fig. 52A, B**), se observó en ambos tipos de pMφ una reducción de los niveles de activación de estas proteínas, lo que es acorde con la conocida participación de p38 MAPK sobre éstas^{149,184,427}. Además, indica que SLAMF8 debía de llevar a cabo su función reguladora negativa a través de una vía independiente de p38 MAPK, ya que se detectaron niveles más altos de fosforilación de p47^{phox} en Ser, p40^{phox} en Thr 154, p38 y ERK1/2 MAPK e inducción de iNOS en los pMφ SLAMF8^{-/-}.

Los resultados obtenidos del pretratamiento combinado con los inhibidores de la PKC y p38 MAPK (**Fig. 52A, B**), indicaron que SLAMF8 modula negativamente la inducción de iNOS a través de una vía independiente de PKC y p38 MAPK, y constataron que estas vías tienen un papel en la activación de NOX2, fosforilación de p38 y ERK1/2 MAPK e inducción de iNOS, ya que su uso combinado generó una reducción en los niveles de estas proteínas en ambos tipos de pMφ.

Por último, quedaría por discutir los resultados obtenidos del pretratamiento con el inhibidor de la PI3K y del efecto de SLAMF8 sobre esta vía. De acuerdo con los resultados obtenidos, y del mismo modo al ocurrido bajo la estimulación con PMA y LPS puro, parece ser que SLAMF8 actúa como regulador negativo a través de la vía PI3K sobre la activación de NOX2, las vías p38

y ERK1/2 MAPK, y también sobre la inducción de iNOS (Fig. 52A, B). El pretratamiento con este inhibidor generó una reducción de la fosforilación de la subunidad p47^{phox} en Ser y de p40^{phox} en Thr 154 hasta niveles basales, no encontrando diferencias entre ambos tipos de pMφ. Para el caso de p38, ERK1/2 MAPK e iNOS, no se redujo totalmente la fosforilación, pero las diferencias significativamente mayores detectadas en los en los pMφ SLAMF8^{-/-} en comparación con los SLAMF8^{+/+} para estas proteínas, desaparecieron bajo el pretratamiento con este inhibidor.

A continuación, se muestra un esquema general (Fig. 73) de cómo SLAMF8 podría actuar regulando negativamente las vías de activación implicadas en la activación de NOX2 e inducción de iNOS, compatibles con los resultados obtenidos del modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

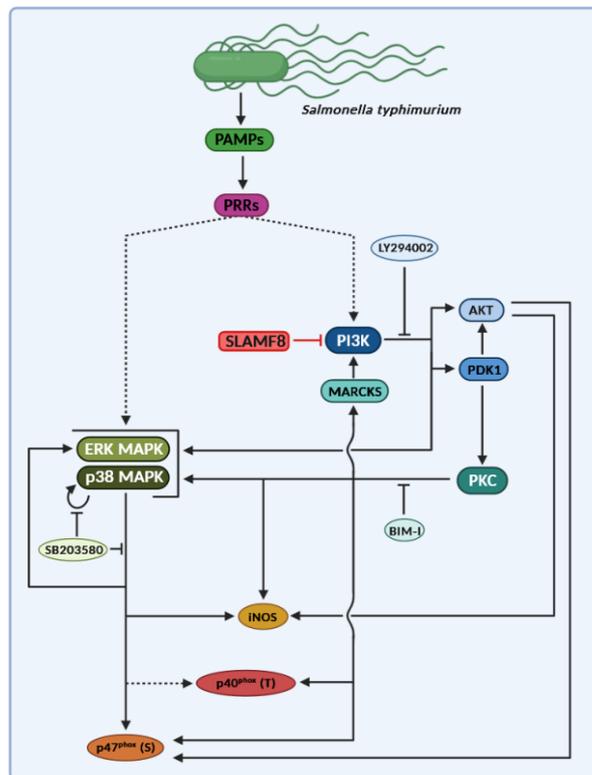


Figura 73. Mecanismo de regulación de SLAMF8 sobre la activación de NOX2 e inducción de iNOS, en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*. *S. typhimurium* sería reconocida por sus PAMPs a través de PRRs. Este reconocimiento induciría cascadas de señalización implicadas en la activación de los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS. Por un lado, estas cascadas de señalización activarían a MAPK que provocaría la activación de NOX2 a través de la fosforilación de la subunidad citosólica p47^{phox}, y promoverían la inducción de iNOS. Por otro lado, se produciría la activación de PI3K, la cual promovería la activación de NOX2 a través de su acción sobre MAPK, AKT y por su acción sobre PKC mediada por PDK1. La inducción de iNOS por medio de PI3K se realizaría a través de AKT y PKC. Al igual que en los casos anteriores, se produciría el bucle de retroalimentación positivo entre la PI3K y la PKC, mediado por PDK1. SLAMF8 ejercería su efecto regulador negativo sobre la PI3K. Bajo el inhibidor de la PI3K, no se encuentran diferencias en la activación de NOX2, inducción de iNOS, ni en la fosforilación de las vías de activación p38 y ERK1/2 MAPK, al comparar los pMφ en presencia o ausencia de SLAMF8. S, serina; T, treonina; BIM-I, Bis-Indol-Maleimida I.

Todos estos resultados confirmarían el papel de SLAMF8 como regulador negativo de la activación de mecanismos microbicidas y de las vías p38 y ERK1/2 MAPK a través de la vía PI3K. Además, la ausencia de SLAMF8 evitaría el control por parte de *S. typhimurium* sobre los mecanismos microbicidas NOX2 e iNOS, debido probablemente a una modificación sobre la composición molecular del SCV en sus diferentes estadios de maduración, en el modelo de infección *in vitro*.

Debido a esto el siguiente objetivo que se abordó, fue el de analizar el papel de SLAMF8 sobre el reclutamiento de proteínas durante la progresión del SCV. Los resultados obtenidos y las conclusiones derivadas son discutidos en el siguiente punto.

3.2. Papel de SLAMF8 sobre la progresión del SCV

La modificación de la fusión fagosoma-lisosoma y la regulación de la activación de NOX2 durante la progresión del SCV, son mecanismos clave empleados por *Salmonella* para asegurar su supervivencia y poder replicarse en M ϕ infectados^{428,429}.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se concluyó que la ausencia de SLAMF8 generaba una mayor fusión de fagosomas con lisosomas y una progresión alterada del SCV ya que se detectaron mayores niveles de colocalización de Rab5 con *S. typhimurium*-GFP en el SCV temprano (**Fig. 53C**) y de Rab7 con *S. typhimurium*-GFP en el SCV intermedio (**Fig. 53D**). Además, se confirmó que SLAMF8 regulaba negativamente el reclutamiento de la subunidad citosólica p47^{phox} al SCV (**Fig. 53E**), corroborando los resultados obtenidos mediante *Western blot* en los que se detectó un nivel significativamente mayor de esta subunidad fosforilada en Ser en los pM ϕ deficientes en SLAMF8, en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro* (**Fig. 51A, B**).

Es importante indicar que la mayor activación detectada de los mecanismos microbicidas, y de las vías p38 y ERK1/2 MAPK, así como la mayor fusión de fagosoma-lisosoma y la progresión alterada del SCV detectada en ausencia de SLAMF8, no se debe a que los pM ϕ SLAMF8^{-/-} presenten una mayor capacidad fagocítica de *S. typhimurium* (**Fig. 54**).

En la progresión del SCV se suceden eventos de fusión entre el fagosoma y estructuras endosomales, las cuales están reguladas por la actividad de la PI3K⁴²⁹. Dado que este proceso está regulado por la PI3K, y los resultados anteriores mostraron la acción reguladora negativa de SLAMF8 sobre esta vía, es lógico pensar que la ausencia de SLAMF8 promueve una mayor actividad PI3K y que ésta se traduce en una mayor activación de los mecanismos microbicidas que impedirían una correcta progresión del SCV y replicación de la bacteria. Además, la

actividad PI3K también está implicada en la regulación de la activación de NOX2 a través de la generación de fosfatidilinositoles¹⁷⁴, lo que explicaría el mayor reclutamiento de p47^{phox} hacia el SCV en ausencia de SLAMF8.

Por tanto, la ausencia de SLAMF8 provocaría un detrimento de la capacidad de *Salmonella* en el control de la progresión del SCV^{379,380} o supondría una mayor capacidad microbicida que según pensamos, podría estar mediada por dos posibles eventos.

El primero está relacionado con el requerimiento de un pH ácido en el SCV por parte de *Salmonella* para su supervivencia y replicación⁴³⁰. Una mayor actividad NOX2 en los pMφ SLAMF8^{-/-} resultaría en una mayor producción de $\cdot\text{O}_2^-$, compuesto que reacciona con los protones introducidos a través de las bombas de protones, lo que produciría un consumo de éstos y por tanto una menor acidificación del fagosoma. De hecho, Wang *et al.*, (2012), demostraron empleando *E. coli* y *S. aureus* que el fagolisosoma es más básico en los Mφ SLAMF8^{-/-}²¹⁸. Pensamos que este evento limitaría la supervivencia y proliferación de *Salmonella*. El segundo evento, que no es excluyente del primero, es por medio de la mayor producción de ROS y RNS, y de sus efectos bacteriostáticos y bactericidas sobre *Salmonella*^{424,431}.

El conjunto de resultados obtenidos nos indica que, bajo el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*, SLAMF8 regula negativamente la activación del Mφ y su ausencia altera la progresión del SCV. Sería necesario un análisis más profundo para averiguar el mecanismo exacto por el cual SLAMF8 es capaz de regular sobre estos procesos, aunque algunas de las posibilidades se discuten a continuación.

SLAMF8, no es el único miembro de la familia capaz de regular sobre estos procesos. Se ha documentado cómo SLAMF1 es capaz de actuar modulando los mecanismos microbicidas pero a diferencia de SLAMF8, SLAMF1 actuaría como un regulador positivo de estos mecanismos, ya que su ausencia genera un retraso en la progresión del fagolisosoma y una menor activación de NOX2 frente a Gram negativas²³⁰. El modo por el que SLAMF1 lleva a cabo su modulación sería a través de la capacidad que tiene de reclutar el complejo formado por Vps34/15-UVRAG, a través de la proteína Beclin-1. Una vez que las porinas de la membrana externa, OmpC y OmpF, de bacterias Gram negativas se unen a SLAMF1, la bacteria es fagocitada y SLAMF1 es consecuentemente internalizado en el fagosoma naciente. A continuación, se produciría el reclutamiento del complejo anteriormente indicado en la región citoplasmática de SLAMF1 que promovería la acumulación de PtdIns3P en el entorno del fagosoma, generando esto la activación de NOX2 y la fusión con endosomas²³⁰.

Dado que SLAMF8 carece de motivos citoplasmáticos conocidos, es poco probable que module la inhibición de señales a través de proteínas adaptadoras, por lo tanto, podría ser a través de la interacción con otros miembros de la familia del SLAM. En este caso, SLAMF8 podría actuar como un inhibidor competitivo de SLAMF1²⁸⁴. Aunque no existe una interacción en *trans* entre SLAMF1 y SLAMF8²¹⁹, una interacción en *cis* de SLAMF8 con SLAMF1 en la misma célula, podría reducir la interacción en *trans* entre SLAMF1 de diferentes células o de éste con el patógeno, al igual que lo descrito para SLAMF2 en células NK⁴³². Por lo tanto, esta inhibición competitiva sobre SLAMF1 podría explicar el mecanismo por el cual SLAMF8 modula sobre la inhibición de señales.

4. Papel de SLAMF8 en la regulación de la expresión de *tlrs*, *Slamf9* e *il-6*, en pMφ infectados con *S. typhimurium*

Existen estudios previos en los que se muestra como algunos de los receptores de la familia del SLAM pueden modular la activación en Mφ por medio de su asociación con TLRs²⁸⁴. Por ejemplo, SLAMF1 media en la señalización vía TLR4 formando un complejo con PI3K-Vps34, tanto en Mφ humanos como de ratón^{317,319}. Por otro lado, recientemente Zeng *et al.* (2020) han propuesto una posible función combinada de SLAMF8 y SLAMF9 en la protección frente a sepsis con LPS mediada también a través del TLR4²⁸⁶.

Nuestros resultados muestran que la infección con *S. typhimurium in vitro* generó un aumento de expresión de *Slamf9* en los pMφ SLAMF8^{+/+} (**Fig. 56**), aunque con una cinética de expresión distinta a *Slamf8* (**Fig. 50A**). El aumento de expresión de éste último, tiene lugar en los momentos iniciales, mientras que la de *Slamf9* ocurre más tarde cuando la expresión de *Slamf8* empieza a decaer. Estos resultados indicarían una separación temporal de expresión entre estos dos miembros, en la que quizás SLAMF8 ejerza su papel en etapas tempranas y que SLAMF9 lo haga en etapas más avanzadas del proceso infeccioso con *Salmonella*. Esto último está en consonancia con lo publicado por otros autores, los cuales han determinado que SLAMF9 se encuentra en APC promoviendo la eliminación de *S. typhimurium in vivo*²⁸⁷.

La expresión separada en el tiempo de diferentes receptores del SLAM ya ha sido previamente documentada. Este es el caso de SLAMF1 y SLAMF8, que por medio de su expresión diferencial es capaz de regular procesos inflamatorios de origen infeccioso, según lo descrito por Wang *et al.* (2015). Éstos proponen que al inicio del proceso se produciría un aumento de expresión de SLAMF1 inducido por el reconocimiento del microorganismo, lo que provocaría una activación de NOX2 y una consecuente producción de ROS. Posteriormente, debido a la producción de

IFN γ en el contexto inflamatorio, la expresión de SLAMF8 aumentaría provocando una disminución de la activación de NOX2 y reduciendo la producción de ROS²¹⁹. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos y en base a estudios previos, es lógico pensar que posiblemente la expresión diferencial de SLAMF8 junto con otros receptores de la familia, puedan regular sobre el desarrollo de los procesos infecciosos.

Al analizar la expresión de *Slamf9* en los pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-}, no encontramos diferencias de expresión entre ambos tipos de pM ϕ (**Fig. 57**), lo que es indicativo de que SLAMF8 no modula la expresión de *Slamf9* en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

El hecho de que SLAMF8 no module sobre la expresión de SLAMF9 bajo este tipo de estímulo, no quiere decir que SLAMF9 no pueda tener una función durante el proceso de infección. Pensamos que SLAMF9, al igual que SLAMF1, puede aumentar la activación del M ϕ en ausencia de SLAMF8. De hecho, Wilson *et al.* (2020) han mostrado que SLAMF9 regula positivamente la producción de citoquinas inflamatorias GM-CSF, TNF α e IL-1 β en M ϕ humanos bajo la estimulación con LPS y que su ausencia genera una menor capacidad de eliminación de *Salmonella*²⁸⁷.

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de expresión de los *tlrs* (**Fig. 57**), encontramos un ligero aumento significativamente mayor de expresión de *tlr2* y *tlr4* en los pM ϕ SLAMF8^{-/-} a la hora de post-infección, en comparación con los procedentes de SLAMF8^{+/+}. Como curiosidad hay que comentar, que estas diferencias se corresponden en el tiempo con el máximo de expresión de *Slamf8* detectado en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro* (**Fig. 50**).

Finalmente, también concluimos que SLAMF8 era capaz de regular de manera negativa la expresión de *il-6* (**Fig. 55**). Este resultado pone de manifiesto el efecto de SLAMF8 sobre la modulación de la respuesta inflamatoria durante procesos infecciosos por medio de la producción de esta citoquina. Este resultado fue confirmado también por medio de los ensayos de sobreexpresión del SLAMF8 murino en la línea celular RAW264.7, ya que la sobreexpresión de SLAMF8 generó una menor expresión de esta citoquina en comparación con las células control (**Fig. 62D**).

Los resultados de expresión de *tlr2*, *tlr4* e *il-6*, difieren de los obtenidos por Zeng *et al.* (2020)²⁸⁶. Estos autores estudiaron la implicación de SLAMF8 y SLAMF9 en la protección frente a un modelo de sepsis inducido por LPS. En primer lugar, describen que la deficiencia de

SLAMF8 en la línea tumoral de M ϕ de ratón RAW264.7 no generó un aumento de expresión de las citoquinas inflamatorias *TNF- α* , *il-1 β* e *il-6*, en comparación con las células control cuando estas fueron estimuladas con LPS. Es importante comentar que en sus ensayos las determinaciones fueron realizadas únicamente a las 6 h. de estimulación con LPS, por lo que una medición más allá de este tiempo hubiese sido relevante para determinar la cinética de expresión de estas citoquinas a lo largo del tiempo. Además, sus experimentos *in vitro* fueron realizados únicamente con LPS y no, como en nuestro caso, con la bacteria completa lo que puede generar una menor activación celular por una menor implicación de receptores de reconocimiento innato. Al analizar la expresión de *tlr2* y *tlr4* bajo el modelo *in vivo* de sepsis con LPS, estos autores comprobaron que la doble deficiencia de SLAMF8 y SLAMF9 inducía una menor expresión de *tlr4* y que la de *tlr2* no se veía afectada, pero todos los ensayos *in vivo* fueron realizados con ratones doble deficientes, no analizando el fenotipo en ratones deficientes únicamente para SLAMF8 o SLAMF9.

Finalmente, no podemos excluir la posibilidad de que al igual que otros miembros de la familia²⁸⁴, SLAMF8 actúe como un receptor para PAMPs o esté asociado con alguno. Recientemente Teng *et al.* (2022), han demostrado que SLAMF8 participa en el rechazo agudo de trasplante de riñón a través de TLR4 en M ϕ proinflamatorios⁴³³. Estos autores han identificado células positivas en SLAMF8 infiltradas en el tejido del órgano rechazado, encontrando que su expresión se da en M ϕ inflamatorios de tipo M1, observando además que estas células también co-expresan TLR4⁴³³, aunque para determinar la acción de SLAMF8 como receptor para PAMPs o determinar su asociación exacta con alguno de ellos, serían necesarios más estudios.

5. Función moduladora de SLAMF8 sobre la vía de activación Src quinasa y la fosfatasa SHP-1, en pM ϕ infectados con *S. typhimurium*

El proceso de activación de los M ϕ , al igual que el de otras células inmunitarias innatas, está regulado por quinasas pertenecientes a la familia de las Src, que una vez activadas promueven la cascada de señalización implicada en el proceso de activación³⁹³.

La activación de las Src quinasas se produce por la defosforilación del residuo Tyr 527 de su dominio de regulación, seguido de la autofosforilación del residuo Tyr 416 localizado en el sitio de activación. La defosforilación del residuo en Tyr 527 está ejecutado por las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs, *Protein Tyrosine Phosphatases*), entre las que destaca SHP-1^{434,435}.

Esta fosfatasa lleva a cabo su acción catalítica sobre las Src cuando se encuentra activada por medio de la fosforilación del residuo Tyr 564 presente en su extremo C-terminal⁴³⁵.

Dada la conocida participación de las Src quinasas y de la fosfatasa SHP-1 en procesos implicados en la eliminación de microorganismos³⁹⁴⁻³⁹⁸ y ya que nuestros resultados mostraban que SLAMF8 actuaba como un regulador negativo sobre la activación de los mecanismos microbicidas, se analizó el papel de SLAMF8 sobre la regulación de la transmisión de señales a través de las Src quinasas y su relación con la fosfatasa SHP-1 en el modelo de infección con *S. typhimurium in vitro*.

Al analizar primeramente el efecto del pretratamiento con IFN γ , se detectó una fosforilación significativamente mayor en el residuo Tyr 416 de las Src quinasas en los pM ϕ deficientes en SLAMF8 (**Fig. 58A, B**). Este resultado es indicativo de que SLAMF8 puede regular de forma negativa la señalización temprana en M ϕ y promover a un estado de pre-activación. Esta idea está respaldada por estudios previos en los que se ha documentado que la señalización a través del IFN γ promueve la activación de las Src quinasas tanto en M ϕ humanos como de ratón⁴³⁶⁻⁴³⁸. Para el resto de proteínas analizadas, bajo el pretratamiento con IFN γ , no se detectaron diferencias entre los pM ϕ SLAMF8^{+/+} y SLAMF8^{-/-} (**Fig. 58A, B**).

Posteriormente, el análisis realizado para determinar el papel de SLAMF8 sobre la activación de las Src quinasas y de la fosfatasa SHP-1 (**Fig. 59A, B**), reveló que la ausencia de SLAMF8 generaba unos niveles de fosforilación significativamente mayores para la forma activa de las Src quinasas además de, sorprendentemente, provocar un detrimento de la activación de la fosfatasa SHP-1.

En conjunto estos resultados indicarían que SLAMF8 actúa regulando negativamente la activación del M ϕ y que su ausencia produce un incremento de la activación de las Src quinasas y una falta de activación de la fosfatasa SHP-1, al menos en los tiempos de infección analizados en nuestro modelo con *Salmonella*.

El motivo por el cual la ausencia de SLAMF8 genera una mayor activación de las Src quinasas y una menor actividad mediada por SHP-1, puede deberse a dos posibles mecanismos (**Fig. 74**). Uno de ellos puede ser por un efecto reforzado por la producción de ROS. Está descrito que una producción elevada de ROS puede inducir una inactivación por oxidación de las proteínas tirosina fosfatasas y una mayor activación de las Src quinasas^{439,440}, por lo que es lógico pensar que una mayor producción de ROS en los pM ϕ SLAMF8^{-/-}³⁴² está promoviendo un mayor aumento de la activación celular por este mecanismo.

Además de este, otro posible mecanismo puede deberse a una posible falta de inhibición competitiva sobre otros miembros de la familia del SLAM, como por ejemplo la sugerida con SLAMF1²⁸⁴. Según esto, pensamos que la ausencia de SLAMF8 haría que los eventos de transducción de señales generados por SLAMF1 estuviesen favorecidos, lo que provocaría un menor reclutamiento de SHP-1 y un mayor reclutamiento de las Src quinasas a través del adaptador citoplasmático SAP, de acuerdo con los modelos de señalización planteados para los miembros de la familia del SLAM²¹⁷.

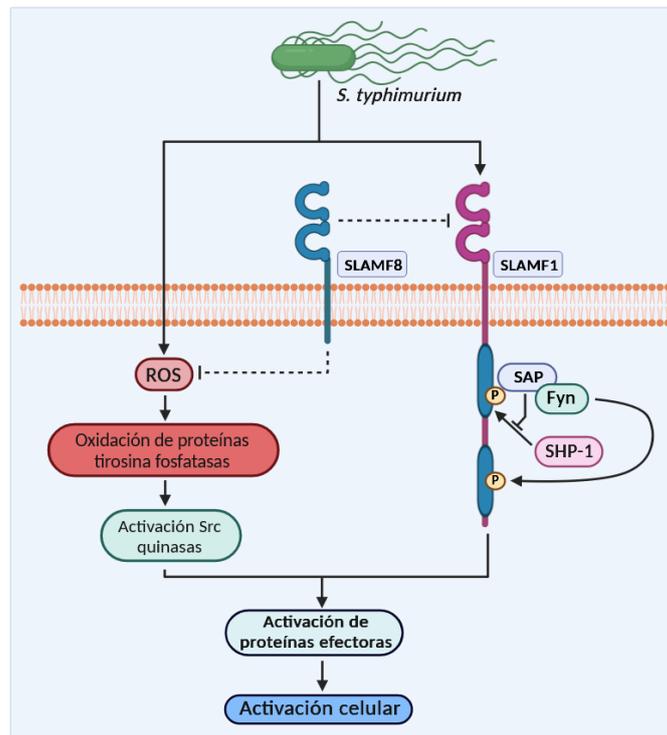


Figura 74. Posibles mecanismos de regulación de SLAMF8 sobre la activación de Mφ inducida a través de la infección por *S. typhimurium*. SLAMF8 podría regular negativamente la activación del Mφ a través de dos posibles mecanismos. Uno de ellos sería a través de su efecto regulador negativo sobre la producción de ROS. La ausencia de SLAMF8 provocaría una mayor producción de ROS con una consecuente mayor oxidación de proteínas tirosina fosfatasa. Esto evitaría la inactivación de las Src quinasas, las cuales promovería finalmente la activación celular por medio de la activación de proteínas efectoras. Otro mecanismo puede ser por la posible acción competitiva de SLAMF8 sobre SLAMF1. SLAMF8 podría actuar como inhibidor competitivo sobre SLAMF1 haciendo que éste no se una al patógeno, controlando la activación celular. La ausencia de SLAMF8 provocaría que la señalización generada por SLAMF1 estuviese favorecida, lo que provocaría por tanto una mayor activación celular.

6. Papel de SLAMF8 en la capacidad microbicida de *S. typhimurium* in vivo

La producción conjunta de ROS y RNS son esenciales para la eliminación de microorganismos por las células fagocíticas^{82,182,403}. Nuestros resultados han mostrado que bajo la infección con *S. typhimurium in vitro*, los mecanismos microbicidas implicados en su producción estaban más activados en los pMφ deficientes en SLAMF8 (Fig. 51A, B).

Estos resultados son coherentes con el hecho de que los ratones SLAMF8^{-/-} presenten una mayor capacidad microbicida que los ratones SLAMF8^{+/+}, no solo a las 24h. post-infección³⁴² sino a las 48h., lo que implica la capacidad de modulación de SLAMF8 *in vivo*. Más relevante aún, es el hecho de haber encontrado un menor número de UFCs de *Salmonella* salvaje y atenuada *in vivo* en los ratones SLAMF8^{-/-} en comparación con los ratones SLAMF8^{+/+} (Fig. 63A), indicativo de que en los ratones SLAMF8^{-/-} la capacidad de replicación de *S. typhimurium in vivo* está reducida. La mayor capacidad microbicida se corroboró con una mayor expresión de iNOS en ratones SLAMF8^{-/-} que SLAMF8^{+/+}, tanto en la población peritoneal como en bazo (Fig. 64A, B).

El efecto de la ausencia de SLAMF8 sobre la eliminación de *Salmonella* no está restringido únicamente a los Mφ. Debemos recordar que la expresión de SLAMF8 no está únicamente descrita en este tipo celular, sino que también se expresa en neutrófilos y DC²¹⁴, por lo que sería lógico pensar que tuviese un papel modulador sobre otros tipos celulares, participando a lo largo del proceso infeccioso, en combinación con la expresión y participación de otros receptores de la familia del SLAM.

Estudios previos han demostrado que la ausencia de SLAMF1 y SLAMF6, los cuales generan un fenotipo contrario al de SLAMF8, producen una mayor susceptibilidad frente a este microorganismo *in vivo*^{230,264}. También se ha determinado recientemente que SLAMF9 modula positivamente el inicio de la inflamación y que se encuentra en las APC, promoviendo la eliminación de *S. typhimurium in vivo*²⁸⁷.

Basándose en lo discutido, se pone de manifiesto el posible papel de SLAMF8 sobre la progresión y resolución de infecciones graves, y cómo esto puede verse modulado también por otros miembros de la familia del SLAM a lo largo del proceso.

7. Estudio del papel de SLAMF8 en macrófagos humanos

Una vez determinada la función reguladora negativa de SLAMF8 en los procesos de activación en M ϕ de ratón *in vitro*, quisimos realizar una aproximación de su papel en humano.

Un estudio previo de nuestro laboratorio reveló que monocitos humanos tratados con IFN γ presentaban una menor fosforilación en Ser de la subunidad citosólica p47^{phox} al ser estimulados con PMA. Resultado probablemente ocasionado por el aumento de expresión de *Slamf8* detectado en estas células en ese estudio³⁴², y previamente descrito²⁶⁸.

Los resultados mostrados en esta tesis doctoral indican que, la sobreexpresión de SLAMF8 humano en la línea celular monocítica humana THP-1 (**Fig. 65A, B**) genera un fenotipo similar al observado en los experimentos de sobreexpresión con su homólogo murino en la línea celular RAW264.7 bajo la estimulación PMA. Los análisis indicaron que las células que sobreexpresaban SLAMF8 presentaron una menor fosforilación de las subunidades citosólicas de NOX2, y de las vías p38 y ERK1/2 MAPK en comparación con las células que no sobreexpresaban SLAMF8. La estimulación con LPS puro solamente generó una reducción significativa de fosforilación para p38 MAPK en las células que sobreexpresaban SLAMF8, en comparación con las que no.

Estos resultados nos indican que el efecto de SLAMF8 sobre la regulación de la activación de NOX2 en monocitos humanos es similar a lo observado en M ϕ de ratón *in vitro*, aunque para determinar sobre qué vía de activación llevaría a cabo su función moduladora, serían necesarios más estudios. Dado el porcentaje de similitud de la secuencia del SLAMF8 murino con el de humano, 75%²¹¹, es razonable que las funciones desempeñadas en M ϕ de ratón sean parecidas en humano.

Debido a que estímulos asociados con procesos inflamatorios generan un aumento de expresión de SLAMF8 en M ϕ ²¹⁸, es lógico pensar que pueda desempeñar una función moduladora en las respuestas inflamatorias en M ϕ del subtipo M1. Pero debido a la plasticidad de funciones asociada a los M ϕ , quisimos analizar también la expresión en M ϕ del subtipo M2, aquellos relacionados con funciones antiinflamatorias²⁴.

Los resultados obtenidos (**Fig. 68**), nos indicaron que la expresión de SLAMF8 aumentaba en los M ϕ del subtipo M1, resultado en concordancia con el trabajo anteriormente comentado, de Teng *et al.* (2022)⁴³³ y que era coherente por la naturaleza del estímulo de diferenciación. Lo curioso fue la detección de expresión de SLAMF8 en M ϕ del subtipo M2.

Estos resultados pondrían sobre el papel la posible implicación de SLAMF8 en la modulación de respuestas pro- y anti-inflamatorias. En un principio, el hecho de observar expresión de SLAMF8 en M ϕ del subtipo M2 parecería contradictorio con el perfil de función planteado para SLAMF8. Quizás la diferenciación hacia el subtipo M2 también genere un aumento o disminución de expresión de otros miembros de la familia del SLAM y dada la conocida interacción entre algunos de los miembros de la familia^{219,285}, cabe la posibilidad de que el balance de expresión entre SLAMF8 con otros miembros de la familia, generen diferentes funciones en base a sus interacciones. Por lo que sería necesario un estudio en profundidad para dar respuesta a esta cuestión.

8. SLAMF8 como posible diana terapéutica. Tratamiento de estados inflamatorios severos o no resueltos e implicación en cáncer

La investigación biomédica nos permite conocer y entender los mecanismos de diferentes procesos biológicos pudiendo seguir este conocimiento a posteriori, diferentes caminos. Uno de ellos puede ser el de seguir planteando nuevas preguntas sobre el mismo proceso para profundizar aún más en su conocimiento, abrir nuevas vías de investigación en otros aspectos relacionados o tener una aplicación clínica para mejorarla salud del paciente, en un estado de enfermedad en el que este proceso biológico esté implicado.

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de una enfermedad es, por tanto, fundamental para la identificación de nuevas dianas o estrategias de tratamiento frente a ella.

La función de NOX2 e iNOS es la de producir ROS y RNS respectivamente, los cuales están implicados en varios fenómenos biológicos y juegan un papel importante en múltiples funciones fisiológicas⁴⁴¹. La principal función de éstos, es la de actuar eliminando microorganismos, aunque también en el caso de ROS pueden actuar en la activación de diferentes vías de señalización, quimiotaxis, presentación cruzada de antígenos y autofagia⁴⁴², mientras que para el caso de las RNS, y en especial el NO, actúan como agentes vasodilatadores, neurotransmisores, y regulando la diferenciación y función de las células inmunitarias^{183,443}.

Dado el potencial químico de estos compuestos como agentes oxidantes, se requiere de mecanismos que regulen molecularmente su producción, ya que una sobreproducción de éstos puede generar daños en componentes celulares (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos)⁴⁴⁴

que provocarían alteración de las funciones celulares, muerte celular y en última instancia, ocasionar enfermedades inflamatorias originadas por estrés oxidativo⁴⁴⁵.

Algunas de ellas pueden ser la inflamación ocasionada por diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple⁴⁴⁶ o artritis reumatoide. Además de originarlas, pueden limitar la recuperación por daño tisular⁴⁴⁷ y afectar a la recuperación de pacientes con enfermedades malignas, por ejemplo, cáncer de colon y de mama⁴⁴⁸. En conjunto, estos estados inflamatorios severos o no resueltos suponen una carga médica considerable, comparada con otras afecciones⁴⁴⁹.

Los estudios anteriores han mostrado que SLAMF8 actúa como un regulador negativo de la producción de ROS a través de la PKC³⁴². Lo novedoso de los resultados aquí mostrados es que nos han permitido concluir además que, SLAMF8 actúa regulando la activación de NOX2 e iNOS a través de su acción moduladora negativa sobre la PI3K en el bucle de retroalimentación de la PKC y PI3K.

Por tanto, una desregulación en la función de SLAMF8 podría ocasionar un aumento en la producción de ROS y RNS que podrían tener un impacto negativo sobre la salud del individuo, promoviendo la aparición de algunas de las enfermedades ocasionadas por estrés oxidativo o afectando a su recuperación. En consecuencia, pensamos que la ausencia de SLAMF8 podría tener un papel en el desarrollo de estas enfermedades y podría ser empleado como diana terapéutica en ellas. Esto abriría una nueva puerta en el campo de la investigación traslacional, cuyo primer punto de partida podría ser, por ejemplo, el análisis de la expresión de SLAMF8 en el contexto de inflamación de estas enfermedades.

Algunas de las posibles estrategias para estas enfermedades, podrían ser por ejemplo la administración de formas solubles de SLAMF8. Es importante recordar que SLAMF8 carece de motivos citoplasmáticos con función moduladora²⁸⁴, por lo que probablemente su función inhibitoria no sería realizada por él mismo a través de proteínas adaptadoras, sino por la interacción con otros miembros de la familia del SLAM actuando como un inhibidor competitivo. En ausencia de SLAMF8, la administración de una forma soluble podría promover la interacción con aquellos miembros que regulan positivamente la activación, inhibiendo sus señales. Esta posibilidad estaría respaldada por el hecho de que existen estudios en los que la administración de formas solubles de SLAMF8 y SLAMF9 en ratones salvajes, consiguieron reducir los niveles de indicadores de daño hepático, así como de citoquinas proinflamatorias, en un modelo de daño hepático inducido por endotoxinas generado por la administración i. p. de LPS/GalN²⁸⁶, por lo que podría ser un tratamiento prometedor para este tipo de afecciones.

Otra posibilidad, podría ser la incorporación como proteína anclada a GPI en las células en las que su expresión esté reducida dentro del ambiente inflamatorio. Esto permitiría la presencia de SLAMF8 en la membrana de las células diana, bien generado por ingeniería genética o por ingeniería de proteínas. Hoy en día, existen una amplia gama de proteínas que han sido incorporadas mediante esta aproximación, por lo que quizás la administración de vesículas con SLAMF8 basada en esta tecnología, pueda tener un potencial clínico para ser empleado en las enfermedades anteriormente indicadas⁴⁵⁰.

Además de la posible relación de SLAMF8 con las enfermedades originadas por estrés oxidativo, lo que sí es un hecho es su relevancia y asociación con diferentes tipos de cáncer. Algunos estudios han mostrado que SLAMF8 puede ser empleado como un biomarcador de ciertos tipos de cáncer y de su progresión³²⁸, y que su expresión puede relacionarse con una posible mejor eficacia de tratamientos de inmunoterapia para algunos de ellos^{329,330}.

La inmunoterapia supone una estrategia prometedora frente a la lucha contra el cáncer. Las terapias de inhibidores de puntos de control inmunitario, transferencia de células T, anticuerpos monoclonales, vacunas de tratamiento y empleo de inmunomoduladores, son distintos tipos de inmunoterapias basadas en diferentes estrategias destinadas a la destrucción de las células tumorales.

En la actualidad existen tratamientos que tienen como diana terapéutica aquellos miembros de la familia del SLAM que se encuentran expresados en tumores. Un ejemplo sería el caso de SLAMF7, sobreexpresado en células de mieloma múltiple⁴⁵¹ y para el que se ha diseñado un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de promover la destrucción de estas células tumorales. Este anticuerpo, denominado elotuzumab³⁴¹, es capaz de reconocer a SLAMF7 a través de la fracción Fab y mediante su unión a través de la fracción Fc al receptor de activación CD16 de las células NK, promueve la citotoxicidad hacia estas células tumorales²¹⁷.

Debido a la asociación de SLAMF8 con algunos tipos de tumores y dado que ya existen tratamientos en los que se emplean algunos miembros de la familia del SLAM como diana terapéutica, es lógico que SLAMF8 también pueda ser empleado con tal fin. Por ejemplo, podrían diseñarse anticuerpos monoclonales frente a SLAMF8, bien conjugados con alguna droga, o del tipo biespecífico, e incluso terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR) específicos de SLAMF8⁴⁵². Estas terapias podrían ser empleadas frente a los tumores en los que se encuentre asociada la expresión de SLAMF8, como podrían ser mastocitosis³²⁶, glioma³²⁸, linfoma anaplásico de células grandes³²⁷, cáncer gástrico³²⁹, cáncer de pulmón de células pequeñas³³⁰ y cáncer colorrectal³³¹.

CONCLUSIONS

1. SLAMF8 negatively modulates NOX2 activation through PI3K and acts as a negative regulator of NOX2 assembly on the cell membrane of mouse macrophages.
2. The negative modulation of SLAMF8 affects cytoskeleton reorganization through actin polymerization under PMA stimuli in mouse macrophages.
3. SLAMF8 negatively regulates mouse macrophage activation by modulation of NOX2 and iNOS induction through PI3K, which affects phagosome-lysosome formation, and thus SCV progression and *il-6* expression in the *in vitro* *S. typhimurium* infection model.
4. In the absence of SLAMF8, the expression of *tlr2* and *tlr4* is slightly increased in mouse macrophages infected with *S. typhimurium in vitro*.
5. SLAMF8 negatively regulates the activation of Src kinases and its absence generates a detriment in the activation of SHP-1 phosphatase, in the *in vitro* infection model with *S. typhimurium* in mouse macrophages.
6. SLAMF8 overexpression in the murine cell line RAW264.7 confirms the negative modulation of this molecule in the activation of NOX2, iNOS and *il-6* expression in mouse macrophages.
7. The absence of SLAMF8 increases the microbicidal capacity and prevents *S. typhimurium* replication *in vivo* showing an increased induction of iNOS in mouse and confirming the role of this receptor as a modulator of the inflammatory response.
8. In human macrophages stimulated with pure LPS and PMA, SLAMF8 overexpression reduces NOX2 activation, p 38 and ERK1/2 MAPK activation pathways. In addition, its expression is detected in M1 and M2 macrophage subtypes obtained in the differentiation of the THP-1 cell line.

CONCLUSIONES

1. SLAMF8 modula negativamente la activación de NOX2 a través de PI3K y actúa como regulador negativo del ensamblaje de NOX2 en la membrana celular de macrófagos de ratón.
2. La modulación negativa de SLAMF8 afecta a la reorganización del citoesqueleto a través de la polimerización de actina, bajo la estimulación con PMA, en macrófagos de ratón.
3. SLAMF8 regula negativamente la activación de macrófagos de ratón mediante la modulación de NOX2 e inducción de iNOS a través de la PI3K, afecta a la formación del fagosoma-lisosoma y por tanto a la progresión del SCV, además de la expresión de *il-6* en el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium*.
4. En ausencia de SLAMF8 se incrementa ligeramente la expresión de *tlr2* y *tlr4* en macrófagos de ratón infectados con *S. typhimurium in vitro*.
5. SLAMF8 regula de manera negativa la activación de las Src quinasas y su ausencia genera un detrimento en la activación de la fosfatasa SHP-1 en el modelo de infección *in vitro* con *S. typhimurium* en macrófagos ratón.
6. La sobreexpresión de SLAMF8 en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 confirma la modulación negativa de esta molécula en la activación de NOX2, iNOS y expresión de *il-6* en macrófagos de ratón.
7. La ausencia de SLAMF8 aumenta la capacidad microbicida e impide la replicación de *S. typhimurium in vivo*, mostrando una mayor inducción de iNOS en ratón y confirmando el papel de este receptor como modulador de la respuesta inflamatoria.
8. En macrófagos humanos estimulados con LPS puro y PMA, la sobreexpresión de SLAMF8 reduce la activación de NOX2, y las vías de activación de p38 y ERK1/2 MAPK. Además, su expresión se detecta en los subtipos de macrófagos M1 y M2 obtenidos en la diferenciación de la línea celular THP-1.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Cavaillon, J. M.** The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 413–424 (2011).
2. **Silverstein, A. M.** *A History of Immunology*. San Diego: Academic Press (1989).
3. **Kaufmann, S.** Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* **9**, 705–712 (2008).
4. **Metchnikoff, E.** *Immunität bei Infektionskrankheiten*. 1-456 (Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1902)
5. **Nathan, C.** Metchnikoff's legacy in 2008. *Nat. Immunol.* **9**, 695–698 (2008).
6. **Kaufmann, S.** Elie Metchnikoff's and Paul Ehrlich's impact on infection biology. *Microbes Infect.* **10**, 1417–1419 (2008).
7. **van Furth, R. et al.** The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
8. **Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A.** The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
9. **Mildner, A. & Jung, S.** Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* **40**, 642–656 (2014).
10. **Gomez-Perdiguero, E. et al.** Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551 (2015).
11. **McGrath, K., Frame, J. & Palis, J.** Early hematopoiesis and macrophage development. *Semin. Immunol.* **27**, 379–387 (2015).
12. **Guilliams, M., Mildner, A. & Yona, S.** Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
13. **Meuret, G.** Origin, ontogeny, and kinetics of mononuclear phagocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1976).
14. **Auffray, C., Sieweke, M. & Geissmann, F.** Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
15. **Ziegler-Heitbrock, L. et al.** Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, 74–80 (2010).
16. **Shi, C. & Pamer, E. G.** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
17. **Ziegler-Heitbrock, L.** Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* **289**, 135–139 (2014).
18. **Ziegler-Heitbrock, L.** The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–592 (2007).
19. **Belge, K. et al.** The Proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542 (2002).
20. **Cros, J. et al.** Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
21. **Murray, P. & Wynn, T.** Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
22. **Gerhardt, T. & Ley, K.** Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* **107**, 321–330 (2015).
23. **Waddell, L. et al.** ADGRE1 (EMR1, F4/80) is a rapidly-evolving gene expressed in mammalian monocyte-macrophages. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).
24. **Murray, P. J. & Wynn, T. A.** Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 557–563 (2011).
25. **Uribe-Querol, E. & Rosales, C.** Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* **11**, 1–13 (2020).
26. **Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R.** DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).
27. **Sameer, A. S. & Nissar, S.** Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res. Int.* **2021**, (2021).
28. **Lee, M. S. & Kim, Y. J.** Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol. Cells* **23**, 1–10 (2007).

29. **Bercusson, A., de Boer, L. & Armstrong-James, D.** Endosomal sensing of fungi: current understanding and emerging concepts. *Med. Mycol.* **55**, 10–15 (2017).
30. **Taban, Q., Mumtaz, P. T., Masoodi, K. Z., Haq, E. & Ahmad, S. M.** Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Commun. Signal.* **20**, 1–17 (2022).
31. **Fitzgerald, K. A. & Kagan, J. C.** Review Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **180**, 1044–1066 (2020).
32. **Fu, Y. L. & Harrison, R. E.** Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front. Immunol.* **12**, 662063 (2021).
33. **Mnich, M. E., van Dalen, R. & van Sorge, N. M.** C-Type Lectin Receptors in Host Defense Against Bacterial Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 1–15 (2020).
34. **Oliveira-Nascimento, L., Massari, P. & Wetzler, L. M.** The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.* **3**, 1–17 (2012).
35. **Huang, H. R. et al.** Dectin-3 Recognizes Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Serotype AD and *Cryptococcus gattii* Serotype B to Initiate Host Defense Against Cryptococcosis. *Front. Immunol.* **9**, 1781 (2018).
36. **Kourtzelis, I., Hajishengallis, G. & Chavakis, T.** Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front. Immunol.* **11**, 1–8 (2020).
37. **Jaumouillé, V. & Grinstein, S.** Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 22–29 (2011).
38. **Springer, T. A.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425–434 (1990).
39. **Freeman, S. A. & Grinstein, S.** Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* **262**, 193–215 (2014).
40. **Ostrowski, P. P., Grinstein, S. & Freeman, S. A.** Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis. *Dev. Cell* **38**, 135–146 (2016).
41. **Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K.** TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 1233–1261 (2021).
42. **Doyle, S. E. et al.** Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *J. Exp. Med.* **199**, 81–90 (2004).
43. **Rosales, C.** Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signal Transduct.* **7**, 386–401 (2007).
44. **Sánchez-Mejorada, G. & Rosales, C.** Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 521–533 (1998).
45. **Futosi, K. & Mócsai, A.** Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol. Rev.* **273**, 121–139 (2016).
46. **Tridandapani, S. et al.** The adapter protein LAT enhances Fcγ receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 20480–20487 (2000).
47. **Bezman, N. & Koretzky, G. A.** Compartmentalization of ITAM and integrin signaling by adapter molecules. *Immunol. Rev.* **218**, 9–28 (2007).
48. **Gu, H., Botelho, R. J., Yu, M., Grinstein, S. & Neel, B. G.** Critical role for scaffolding adapter Gab2 in FcγR-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* **161**, 1151–1161 (2003).
49. **Cox, D., Tseng, C. C., Bjekic, G. & Greenberg, S.** A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**, 1240–1247 (1999).
50. **Botelho, R. J. et al.** Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J. Cell Biol.* **151**, 1353–1367 (2000).
51. **Marshall, J. G. et al.** Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* **153**, 1369–1380 (2001).
52. **Scott, C. C. et al.** Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J. Cell Biol.* **11**, 139–149 (2005).
53. **Larsen, E. C. et al.** Differential Requirement for Classic and Novel PKC Isoforms in Respiratory Burst and Phagocytosis in RAW 264.7 Cells. *J. Immunol.* **165**, 2809–2817 (2000).
54. **Sánchez-Mejorada, G. & Rosales, C.** Fcγ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **273**, 27610–27619 (1998).
55. **Hoppe, A. D. & Swanson, A.** Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3509–3519 (2004).
56. **Aderem, A. & Underhill, D. M.** Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev.*

- Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
57. **Caron, E. & Hall, A.** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717–21 (1998).
 58. **May, R. C., Caron, E., Hall, A. & Machesky, L. M.** Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat. Cell Biol.* **2**, 246–248 (2000).
 59. **Allen, L. A. H. & Aderem, A.** Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**, 627–637 (1996).
 60. **Levin, R., Grinstein, S. & Canton, J.** The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol. Rev.* **273**, 156–179 (2016).
 61. **Canton, J.** Phagosome maturation in polarized macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 729–738 (2014).
 62. **Fairn, G. D. & Grinstein, S.** How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* **33**, 397–405 (2012).
 63. **Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. & Zerial, M.** The rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621–625 (1999).
 64. **Gabriel-Gutierrez, M.** Functional role(s) of phagosomal Rab GTPases. *Small GTPases* **4**, 37–41 (2013).
 65. **Kitano, M., Nakaya, M., Nakamura, T., Nagata, S. & Matsuda, M.** Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* **453**, 241–245 (2008).
 66. **Vieira, O. V. et al.** Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* **155**, 19–25 (2001).
 67. **Jeschke, A. & Haas, A.** Deciphering the roles of phosphoinositide lipids in phagolysosome biogenesis. *Commun. Integr. Biol.* **9**, 1–26 (2016).
 68. **Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B. H. & Stenmark, H.** Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur. J. Biochem.* **265**, 361–366 (1999).
 69. **Araki, N., Johnson, M. T. & Swanson, J. A.** A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* **135**, 1249–1260 (1996).
 70. **Vieira, O. V. et al.** Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2501–2514 (2003).
 71. **Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M.** Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735–749 (2005).
 72. **Kinchen, J. M. & Ravichandran, K. S.** Phagosome maturation: Going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 781–795 (2008).
 73. **Marshansky, V. & Futai, M.** The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 415–426 (2008).
 74. **Luzio, J. P., Gray, S. R. & Bright, N. A.** Endosome-lysosome fusion. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1413–1416 (2010).
 75. **Desjardins, M. & Griffiths, G.** Phagocytosis: Latex leads the way. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 498–503 (2003).
 76. **Vieira, O. V., Botelho, R. J. & Grinstein, S.** Phagosome maturation: Aging gracefully. *Biochem. J* **366**, 689–704 (2002).
 77. **Pauwels, A. M., Trost, M., Beyaert, R. & Hoffmann, E.** Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. *Trends Immunol.* **38**, 407–422 (2017).
 78. **Vignais, P. V.** The superoxide-generating NADPH oxidase: Structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1428–1459 (2002).
 79. **Reeves, E. P. et al.** Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**, 291–297 (2002).
 80. **Babior, B. M.** NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464–76 (1999).
 81. **Cross, A. R. & Segal, A. W.** The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochem. Biophys. Acta* **1657**, 1–22 (2004).
 82. **Lambeth, J. D.** NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189 (2004).
 83. **Nauseef, W. M.** Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 277–291 (2004).

84. **Groemping, Y. & Rittinger, K.** Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* **386**, 401–416 (2005).
85. **DeLeo, F. R. et al.** Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 13986–13993 (2000).
86. **Paclet, M. H., Enderson, L. M., Campion, Y., Morel, F. & Dagher, M. C.** Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem. J.* **382**, 981–986 (2004).
87. **Belambri, S. A. et al.** NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, 1–9 (2018).
88. **Cross, A. R., Erickson, R. W. & Curnutte, J. T.** Simultaneous presence of p47phox and flavocytochrome b-245 are required for the activation of NADPH oxidase by anionic amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **274**, 15519–15525 (1999).
89. **Doussière, J., Gaillard, J. & Vignais, P. V.** Electron transfer across the O₂- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* **35**, 13400–13410 (1996).
90. **Isogai, Y., Iizuka, T. & Shiro, Y.** The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558. *J. Biol. Chem.* **270**, 7853–7857 (1995).
91. **Koshkin, V., Lotan, O. & Pick, E.** Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 139–146 (1997).
92. **Sumimoto, H. et al.** Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *PNAS* **91**, 5345–5349 (1994).
93. **Leto, T. L., Adams, A. G. & De Mendez, I.** Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: Binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *PNAS* **91**, 10650–10654 (1994).
94. **El Benna, J., Dang, P. M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., Marie, J. C. & Braut-Boucher, F.** p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* **41**, 217–25 (2009).
95. **Ellson, C. D. et al.** PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. *Nat. Cell Biol.* **3**, 679–682 (2001).
96. **Kanai, F. et al.** The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* **3**, 675–678 (2001).
97. **Quinn, M. T. & Gauss, K. A.** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 760–781 (2004).
98. **Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A. W. & Hall, A.** Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* **265**, 531–533 (1994).
99. **Koga, H. et al.** Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 25051–25060 (1999).
100. **Nisimoto, Y., Freeman, J. L. R., Motalebi, S. A., Hirshberg, M. & Lambeth, J. D.** Rac Binding to p67phox. *J. Biol. Chem.* **272**, 18834–18841 (1997).
101. **Dang, P. M. C., Babior, B. M. & Smith, R. M.** NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* **38**, 5746–5753 (1999).
102. **Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A. & Lambert, J. D.** Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67phox. *J. Biol. Chem.* **273**, 16663–16668 (1998).
103. **Kuribayashi, F. et al.** The adaptor protein p40phox as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* **21**, 6312–6320 (2002).
104. **Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T. & Williams, R. L.** PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol. Cell* **12**, 39–50 (2003).
105. **Leto, T. L. et al.** Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science* **248**, 727–730 (1990).
106. **Grizot, S. et al.** Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* **40**, 3127–3133 (2001).
107. **Fuchs, A., Dagher, M. C. & Vignais, P. V.** Mapping the domains of interaction of p40(phox) with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J.*

- Biol. Chem.* **270**, 5695–5697 (1995).
108. **van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C.** Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295–2322 (1997).
 109. **Bishop, A. L. & Hall, A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**, 241–255 (2000).
 110. **Etienne-Manneville, S. & Hall, A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
 111. **Haataja, L., Groffen, J. & Heisterkamp, N.** Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J. Biol. Chem.* **272**, 20384–20388 (1997).
 112. **Roberts, A. W. et al.** Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* **10**, 183–196 (1999).
 113. **Kim, C. & Dinauer, M. C.** Rac2 Is an Essential Regulator of Neutrophil Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activation in Response to Specific Signaling Pathways. *J. Immunol.* **166**, 1223–1232 (2001).
 114. **Gu, Y. et al.** Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases. *Sci. Rep.* **302**, 445–449 (2003).
 115. **Filippi, M. D. et al.** Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nat. Immunol.* **5**, 744–751 (2004).
 116. **Lapouge, K. et al.** Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac-GTP. *Mol. Cell* **6**, 899–907 (2000).
 117. **Zhang, S. et al.** Rho Family GTPases Regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the Downstream Mediator Pak1. *Biochemistry* **10**, 23934–23936 (1995).
 118. **Wells, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. & Ridley, A. J.** Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J. Cell Sci.* **117**, 1259–68 (2004).
 119. **Ridley, A. J.** Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).
 120. **Mao, Y. & Finnemann, S. C.** Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases* **6**, 1–11 (2015).
 121. **Bokoch, G. M.** Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* **15**, 163–171 (2005).
 122. **Bouin, A. P., Grandvaux, N., Vignais, P. V. & Fuchs, A.** p40phox is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 30097–30103 (1998).
 123. **Someya, A., Nuno, H., Hasebe, T. & Nagaoka, I.** Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 851–857 (1999).
 124. **El Benna, J., Faust, L. R. P., Johnson, J. L. & Babior, B. M.** Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47 as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping. *J. Biol. Chem.* **271**, 6374–6378 (1996).
 125. **El Benna, J. et al.** Activation of p38 in stimulated human neutrophils: Phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 395–400 (1996).
 126. **Ago, T., Nuno, H., Ito, T. & Sumimoto, H.** Mechanism for Phosphorylation-induced Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase Protein p47. *J. Biol. Chem.* **274**, 33644–33653 (1999).
 127. **Dang, P. M. C., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J. & Perianin, A.** Protein Kinase C ζ Phosphorylates a Subset of Selective Sites of the NADPH Oxidase Component p47 phox and Participates in Formyl Peptide-Mediated Neutrophil Respiratory Burst. *J. Immunol.* **166**, 1206–1213 (2001).
 128. **Inanami, O. et al.** Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J. Biol. Chem.* **273**, 9539–9543 (1998).
 129. **Dang, P. M. C. et al.** A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **116**, 2033–2043 (2006).
 130. **Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M. A. & El-Benna, J.** The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Is Involved in formyl-Methionyl-Leucyl-

- Phenylalanine-Induced p47 phox Phosphorylation in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **165**, 5238–5244 (2000).
131. **Chen, Q. et al.** Akt Phosphorylates p47phox and Mediates Respiratory Burst Activity in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **170**, 5302–5308 (2003).
 132. **Pacquelet, S. et al.** Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem. J.* **403**, 451–461 (2007).
 133. **Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Cui, Y. D. & 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.* **467**, 253–258 (2000).
 134. **Black, A. R. & Black, J. D.** Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front. Immunol.* **3**, 1–18 (2013).
 135. **Gresset, A., Sondak, J. & Harden, T. K.** The Phospholipase C Isozymes and Their Regulation. *Subcell. Biochem.* **58**, 61–94 (2012).
 136. **Erickson, R. W., Langel-Peveri, P., Traynor-Kaplan, A. E., Heyworth, P. G. & Curnutte, J. T.** Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **274**, 22243–22250 (1999).
 137. **Yamamori, T. et al.** Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1571–1578 (2002).
 138. **Zarubin, T. & Han, J.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* **15**, 11–18 (2005).
 139. **Lavoie, H., Gagnon, J. & Therrien, M.** ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 607–632 (2020).
 140. **Boulton, T. G. et al.** ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663–675 (1991).
 141. **Fontayne, A., Dang, P. M. C., Gougerot-Pocidallo, M. A. & El Benna, J.** Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, δ , and ζ : effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* **41**, 7743–7750 (2002).
 142. **Kawakami, N. et al.** Indication of a protein kinase C-independent pathway for NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 89–94 (1998).
 143. **Reeves, E. P. et al.** Direct interaction between p47phox and protein kinase C: Evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem. J.* **344**, 859–866 (1999).
 144. **El Benna, J. et al.** Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 395–400 (1996).
 145. **Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M. A. & 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.* **165**, 5238–5244 (2000).
 146. **Knaus, U. G., Morris, S., Dong, H. J., Chernoff, J. & Bokoch, G. M.** Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* **269**, 221–223 (1995).
 147. **Park, H. S. et al.** Phosphorylation of the leukocyte nadph oxidase subunit p47phox by casein kinase 2: Conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *Biochem. J.* **358**, 783–790 (2001).
 148. **Hoyal, C. R. et al.** Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *PNAS* **100**, 5130–5135 (2003).
 149. **El Benna, J., Faust, L. P. & 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.* **269**, 23431–23436 (1994).
 150. **Makni-Maalej, K. et al.** The TLR7/8 Agonist CL097 Primes N -Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Stimulated NADPH Oxidase Activation in Human Neutrophils: Critical Role of p47phox Phosphorylation and the Proline Isomerase Pin1. *J. Immunol.* **189**, 4657–4665 (2012).
 151. **Boussetta, T. et al.** The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* **116**, 5795–5802 (2010).

152. **Brown, G. E. et al.** Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 27059–27068 (2004).
153. **El Benna, J. et al.** Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67phox during Human Neutrophil Activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 17204–17208 (1997).
154. **Dang, P. M. C., Morel, F., Gougerot-Pocidalo, M. A. & El Benna, J.** Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67PHOX by ERK2 and P38MAPK: Selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* **42**, 4520–4526 (2003).
155. **Ahmed, S. et al.** Cryptic Rac-binding and p21Cdc42HS/Rac-activated Kinase Phosphorylation Sites of NADPH Oxidase Component p67phox. *Biochemistry* **273**, 15693–15701 (1998).
156. **Dang, P. M. C., Cross, A. R. & Babior, B. M.** Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: A direct interaction between p67phox and cytochrome b558. *PNAS* **98**, 3001–3005 (2001).
157. **Raad, H. et al.** 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.* **23**, 1011–22 (2009).
158. **Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F.** The GTPase superfamily: A conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125–132 (1990).
159. **Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D. & Gierschik, P.** The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122–126 (2000).
160. **Hoffman, G. R., Nassar, N. & Cerione, R. A.** Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345–356 (2000).
161. **Price, M. O., Atkinson, S. J., Knaus, U. G. & Dinauer, M. C.** Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J. Biol. Chem.* **277**, 19220–19228 (2002).
162. **Heyworth, P. G., Bohl, B. P., Bokoch, G. M. & Curnutte, J. T.** Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox: evidence for its interaction with flavocytochrome b 558. *J. Biol. Chem.* **269**, 30749–30752 (1994).
163. **Burridge, K. & Wennerberg, K.** Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* **116**, 167–179 (2004).
164. **Bokoch, G. M.** Chemoattractant Signaling and Leukocyte Activation. *Blood* **86**, 1649–1660 (1995).
165. **Takashi, A., Hirofumi, K. & Hideki, S.** Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **274**, 18055–18059 (1999).
166. **Arbibe, L. et al.** Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 533–40 (2000).
167. **Equils, O. et al.** Rac1 and Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein Mediate Toll-Like Receptor 4 Induction of HIV-Long Terminal Repeat. *J. Immunol.* **172**, 7642–7646 (2004).
168. **Yamauchi, A. et al.** Rac2-Deficient Murine Macrophages Have Selective Defects in Superoxide Production and Phagocytosis of Opsonized Particles. *J. Immunol.* **173**, 5971–5979 (2004).
169. **Chimini, G. & Chavrier, P.** Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* **2**, 191–196 (2000).
170. **Freeman, J. L., Abo, A. & Lambeth, J. D.** Rac ‘insert region’ is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J. Biol. Chem.* **271**, 19794–19801 (1996).
171. **Gorzalczany, Y., Alloul, N., Sigal, N., Weinbaum, C. & Pick, E.** A prenylated p67phox-Rac1 chimera elicits NADPH-dependent superoxide production by phagocyte membranes in the absence of an activator and of p47phox. *J. Biol. Chem.* **277**, 18605–18610 (2002).
172. **Diebold, B. A. & Bokoch, G. M.** Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* **2**, 211–215 (2001).
173. **Vanhaesebroeck, B. et al.** Synthesis and function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 535–602 (2001).
174. **Hawkins, P. T., Davidson, K. & Stephens, L. R.** The role of PI3Ks in the regulation of the neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. Soc. Symp.* **74**, 59–67 (2007).

175. **Ellson, C. D. et al.** Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr. Biol.* **11**, 1631–1635 (2001).
176. **Perisic, O. et al.** The role of phosphoinositides and phosphorylation in regulation of NADPH oxidase. *Adv. Enzyme Regul.* **44**, 279–298 (2004).
177. **Yaffe, M. B.** The p47phox PX domain: Two heads are better than one! *Structure* **10**, 1288–1290 (2002).
178. **Waite, K. A., Wallin, R., Qualliotine-Mann, D. & McPhail, L. C.** Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. *J. Biol. Chem.* **272**, 15569–15578 (1997).
179. **Iyer, S. S., Barton, J. A., Bourgojn, S. & Kusner, D. J.** Phospholipases D1 and D2 Coordinately Regulate Macrophage Phagocytosis. *J. Immunol.* **173**, 2615–2623 (2004).
180. **Kalachova, T., Iakovenko, O., Kretinin, S. & Kravets, V.** Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiol. Biochem.* **66**, 127–133 (2013).
181. **MacMicking, J., Xie, Q. W. & Nathan, C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323–350 (1997).
182. **Chakravorty, D. & Hensel, M.** Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect.* **5**, 621–627 (2003).
183. **Xue, Q., Yan, Y., Zhang, R. & Xiong, H.** Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–13 (2018).
184. **Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P. & Silverman, R. B.** Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med. Res. Rev.* **40**, 158–189 (2020).
185. **Förstermann, U. & Sessa, W. C.** Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 1–13 (2012).
186. **Fernhoff, N. B., Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A.** A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *PNAS* **106**, 21602–21607 (2009).
187. **Minhas, R., Bansal, Y. & Bansal, G.** Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. *Med. Res. Rev.* **40**, 823–855 (2020).
188. **Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R.** The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* **424**, 37–49 (1999).
189. **Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. & Schwarz, P. M.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 255–266 (2004).
190. **Pautz, A. et al.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* **23**, 75–93 (2010).
191. **Zhou, X., Yang, W. & Li, J.** Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor- κ B activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 31337–31347 (2006).
192. **Dell’Albani, P. et al.** JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* **65**, 417–424 (2001).
193. **Alderton, W. K. et al.** GW274150 and GW273629 are potent and highly selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 301–312 (2005).
194. **Kone, B. C., Kuncewicz, T., Zhang, W. & Yu, Z. Y.** Protein interactions with nitric oxide synthases: Controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **285**, 178–190 (2003).
195. **Sharma, J. N., Al-Omran, A. & Parvathy, S. S.** Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* **15**, 252–259 (2007).
196. **Titheradge, M. A.** Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 437–455 (1999).
197. **Cocks, B. G. et al.** A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260–263 (1995).
198. **Davis, S. J. & van Der Merwe, P. A.** The structure and ligand interactions of CD2: Implications for T-cell function. *Immunol. Today* **17**, 177–187 (1996).
199. **Sydorenko, S. P. & Clark, E. A.** Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J. Immunol.* **151**, 4614–4624 (1993).
200. **de la Fuente, M. A., Pizcueta, P., Nadal, M., Bosch, J. & Engel, P.** CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* **90**, 2398–405 (1997).
201. **Krause, S. W., Rehli, M., Heinz, S., Ebner, R. & Andreesen, R.** Characterization of MAX.3 antigen,

- a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: identity with CD84. *Biochem. J.* **346**, 729–36 (2000).
202. **Sandrin, M. S. et al.** Isolation and characterization of cDNA clones for mouse Ly-9. *J. Immunol.* **149**, 1636–41 (1992).
 203. **de la Fuente, M. A. et al.** Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood* **97**, 3513–3520 (2001).
 204. **Mathew, P. A. et al.** Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* **151**, 5328–37. (1993).
 205. **Tangye, S. G. et al.** Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* **162**, 6981–6985 (1999).
 206. **Peck, S. R. & Ruley, E. H.** Ly108: A new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* **52**, 63–72 (2000).
 207. **Bottino, C. et al.** NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Exp. Med.* **194**, 235–246 (2001).
 208. **Fraser, C. C. et al.** Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics* **53**, 843–850 (2002).
 209. **Bouchon, A., Cella, M., Grierson, H. L., Cohen, J. I. & Colonna, M.** Cutting Edge: Activation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by a SAP-Independent Receptor of the CD2 Family. *J. Immunol.* **167**, 5517–5521 (2001).
 210. **Tovar, V. et al.** Mouse novel Ly9: A new member of the expanding CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics* **54**, 394–402 (2002).
 211. **Kingsbury, G. A. et al.** Cloning, Expression, and Function of BLAME, a Novel Member of the CD2 Family. *J. Immunol.* **166**, 5675–5680 (2001).
 212. **Zhang, W. et al.** Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clin. Cancer Res.* **7**, 882–829 (2001).
 213. **Engel, P., Eck, M. J. & Terhorst, C.** The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 813–821 (2003).
 214. **Calpe, S. et al.** The SLAM and SAP Gene Families Control Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv. Immunol.* **97**, 177–250 (2008).
 215. **Veillette, A.** SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–15 (2010).
 216. **Kiel, M. J. et al.** SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
 217. **Wu, N. & Veillette, A.** SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 45–51 (2016).
 218. **Wang, G. et al.** Cutting Edge: Slamf8 Is a Negative Regulator of Nox2 Activity in Macrophages. *J. Immunol.* **188**, 5829–5832 (2012).
 219. **Wang, G. et al.** Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
 220. **Veillette, A., Cruz-Munoz, M. E. & Zhong, M. C.** SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol.* **27**, 228–234 (2006).
 221. **Cannons, J. L., Tangye, S. G. & Schwartzberg, P. L.** SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 665–705 (2011).
 222. **Calpe, S. et al.** Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adaptors. *Immunogenetics* **58**, 15–25 (2006).
 223. **Magari, M. et al.** The immunoreceptor SLAMF8 promotes the differentiation of follicular dendritic cell-dependent monocytic cells with B cell-activating ability. *FEBS Lett.* **596**, 2659–2667 (2022).
 224. **Sayos, J. et al.** The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462–469 (1998).
 225. **Munitz, A. et al.** 2B4 (CD244) Is Expressed and Functional on Human Eosinophils. *J. Immunol.* **174**, 110–118 (2005).

226. **Nanda, N. et al.** Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* **106**, 3028–3034 (2011).
227. **Yusuf, I. et al.** Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150). *J. Immunol.* **185**, 190–202 (2010).
228. **Cannons, J. L. et al.** Optimal Germinal Center Responses Require a Multistage T Cell:B Cell Adhesion Process Involving Integrins, SLAM-Associated Protein, and CD84. *Immunity* **32**, 253–265 (2010).
229. **Griewank, K. et al.** Homotypic Interactions Mediated by Slamf1 and Slamf6 Receptors Control NKT Cell Lineage Development. *Immunity* **27**, 751–762 (2007).
230. **Berger, S. B. et al.** SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 920–927 (2010).
231. **Sidorenko, S. P. & Clark, E. A.** Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol.* **151**, 4614–4624 (1993).
232. **Mavaddat, N. et al.** Signaling Lymphocytic Activation Molecule (CDw150) Is Homophilic but Self-associates with Very Low Affinity. *J. Biol. Chem.* **275**, 28100–28109 (2000).
233. **Castro, A. G. et al.** Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* **163**, 5860–5870 (1999).
234. **Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y.** Slam (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893–897 (2000).
235. **Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. & Modlin, R. L.** Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **167**, 3174–81 (2001).
236. **Romero, X. et al.** Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* **64**, 132–144 (2004).
237. **Wang, N. et al.** The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J. Exp. Med.* **199**, 1255–1264 (2004).
238. **Yokoyama, S. et al.** Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J. Immunol.* **146**, 2192–200 (1991).
239. **Baorto, D. M. et al.** Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**, 636–639 (1997).
240. **Kato, K. et al.** CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J. Exp. Med.* **176**, 1241–1249 (1992).
241. **Minai-Fleminger, Y. et al.** The CD48 receptor mediates Staphylococcus aureus human and murine eosinophil activation. *Clin. Exp. Allergy* **44**, 1335–1346 (2014).
242. **Redegeld, F. A., Yu, Y., Kumari, S., Charles, N. & Blank, U.** Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol. Rev.* **282**, 87–113 (2018).
243. **Sandrin, M. S. et al.** Isolation and characterization of cDNA clones for Humly9: the human homologue of mouse Ly9. *Immunogenetics* **43**, 13–19 (1995).
244. **Sayos, J., Martin, M., Chen, A., Simarro, M. & Howie, D. et al.** Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* **97**, 3867–3874 (2001).
245. **Sintes, J., Vidal-Laliena, M., Romero, X., Tovar, V. & Engel, P.** Characterization of mouse CD229 (Ly9), a leukocyte cell surface molecule of the CD150 (SLAM) family. *Tissue Antigens* **70**, 355–362 (2007).
246. **Chtanova, T. et al.** T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J. Immunol.* **173**, 68–78 (2004).
247. **Lee, K. M. et al.** 2B4 Acts As a Non-Major Histocompatibility Complex Binding Inhibitory Receptor on Mouse Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* **199**, 1245–1254 (2004).
248. **Brown, B. M. H. et al.** 2B4, the Natural Killer and T Cell Immunoglobulin Superfamily Surface Protein, Is a Ligand for CD48. *J. Exp. Med.* **188**, 2083–2090 (1998).
249. **Garni-Wagner, B. A., Purohit, A., Mathew, P. A., Bennett, M. & Kumar, V.** A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural

- killer cells and T cells. *J. Immunol.* **151**, 60–70 (1993).
250. **Valiante, N. M. & Trinchieri, G.** Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 1397–1406 (1993).
 251. **Kambayashi, T., Assarsson, E., Chambers, B. J. & Ljunggren, H. G.** Cutting Edge: Regulation of CD8 + T Cell Proliferation by 2B4/CD48 Interactions. *J. Immunol.* **167**, 6706–6710 (2001).
 252. **Laouar, A. et al.** Cutting Edge: Distinct NK Receptor Profiles Are Imprinted on CD8 T Cells in the Mucosa and Periphery during the Same Antigen Challenge: Role of Tissue-Specific Factors. *J. Immunol.* **178**, 652–656 (2007).
 253. **Latchman, Y., McKay, P. F. & Reiser, H.** Cutting Edge: Identification of the 2B4 Molecule as a Counter-Receptor for CD48. *J. Immunol.* **161**, 5809–5812 (1998).
 254. **Sayós, J. et al.** Potential pathways for regulation on NK and T cell responses: Differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int. Immunol.* **12**, 1749–1757 (2000).
 255. **Speiser, D. E. et al.** The Activatory Receptor 2B4 Is Expressed In Vivo by Human CD8 + Effector $\alpha\beta$ T Cells. *J. Immunol.* **167**, 6165–6170 (2001).
 256. **Tangye, S. G., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Nichols, K. E.** Cutting Edge: Functional Requirement for SAP in 2B4-Mediated Activation of Human Natural Killer Cells as Revealed by the X-Linked Lymphoproliferative Syndrome. *J. Immunol.* **165**, 2932–2936 (2000).
 257. **Martin, M. et al.** CD84 Functions as a Homophilic Adhesion Molecule and Enhances IFN- Secretion: Adhesion Is Mediated by Ig-Like Domain 1. *J. Immunol.* **167**, 3668–3676 (2001).
 258. **Tangye, S. G., van de Weerd, B. C. M., Avery, D. T. & Hodgkin, P. D.** CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1640–1649 (2002).
 259. **Vinuesa, C. G. et al.** A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* **435**, 452–458 (2005).
 260. **de la Fuente, M. A. et al.** Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* **49**, 249–255 (1999).
 261. **King, C., Tangye, S. G. & Mackay, C. R.** T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741–766 (2008).
 262. **Flaig, R. M., Stark, S. & Watzl, C.** Cutting Edge: NTB-A Activates NK Cells via Homophilic Interaction. *J. Immunol.* **172**, 6524–6527 (2004).
 263. **Falco, M. et al.** Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: Induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1663–1672 (2004).
 264. **Howie, D. et al.** Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J. Immunol.* **174**, 5931–5935 (2005).
 265. **Cruz-Munoz, M. E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S. & Veillette, A.** Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat. Immunol.* **10**, 297–305 (2009).
 266. **Kumaresan, P. R., Lai, W. C., Chuang, S. S., Bennett, M. & Mathew, P. A.** CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol. Immunol.* **39**, 1–8 (2002).
 267. **Boles, K. S. & Mathew, P. A.** Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* **52**, 302–307 (2001).
 268. **Kingsbury, G. A. et al.** Cloning, Expression, and Function of BLAME, a Novel Member of the CD2 Family. *J. Immunol.* **166**, 5675–5680 (2001).
 269. **Fennelly, J. A., Tiwari, B., Davis, S. J. & Evans, E. J.** CD2F-10: A new member of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics* **53**, 599–602 (2001).
 270. **Sever, L. et al.** SLAMF9 regulates pDC homeostasis and function in health and disease. *PNAS* **116**, 16489–16496 (2019).
 271. **Staunton, D. E. & Thorley-Lawson, D. A.** Molecular cloning of the lymphocyte activation marker Blast-1. *EMBO J.* **6**, 3695–3701 (1987).
 272. **Staunton, D. E. et al.** Blast-1 possesses a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane anchor, is related to LFA-3 and OX-45, and maps to chromosome 1q21-23. *J. Exp. Med.* **169**, 1087–1099

- (1989).
273. **Ma, C. S., Nichols, K. E. & Tangye, S. G.** Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by the SLAM and SAP Families of Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 337–379 (2007).
274. **Nichols, K. E., Ma, C. S., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L. & Tangye, S. G.** Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol. Rev.* **203**, 180–199 (2005).
275. **Veillette, A.** Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol. Rev.* **214**, 22–34 (2006).
276. **Morra, M. et al.** Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* **20**, 5840–5852 (2001).
277. **Li, S. C. et al.** Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr. Biol.* **9**, 1355–1362 (1999).
278. **Poy, F. et al.** Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol. Cell* **4**, 555–561 (1999).
279. **Chen, R. et al.** Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5144–5156 (2004).
280. **Fouquet, G. et al.** Signaling lymphocytic activation molecules Slam and cancers: friends or foes? *Oncotarget* **9**, 16248–16262 (2018).
281. **Cao, E. et al.** NTB-A Receptor Crystal Structure: Insights into Homophilic Interactions in the Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor Family. *Immunity* **25**, 559–570 (2006).
282. **Velikovskiy, C. A. et al.** Structure of Natural Killer Receptor 2B4 Bound to CD48 Reveals Basis for Heterophilic Recognition in Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family. *Immunity* **27**, 572–584 (2007).
283. **Yan, Q. et al.** Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *PNAS* **104**, 10583–10588 (2007).
284. **van Driel, B. J., Liao, G., Engel, P. & Terhorst, C.** Responses to microbial challenges by SLAMF receptors. *Front. Immunol.* **7**, 1–14 (2016).
285. **Dragovich, M. A. & Mor, A.** The SLAM family receptors: Potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **17**, 674–682 (2018).
286. **Zeng, X. et al.** Combined deficiency of SLAMF8 and SLAMF9 prevents endotoxin-induced liver inflammation by downregulating TLR4 expression on macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 153–162 (2020).
287. **Wilson, T. J. et al.** Signalling lymphocyte activation molecule family member 9 is found on select subsets of antigen-presenting cells and promotes resistance to Salmonella infection. *Immunology* **159**, 393–403 (2020).
288. **Mathew, S. O. et al.** Mutational analysis of the human 2B4 (CD244)/CD48 interactions: Lys68 and Glu70 in the V domain of 2B4 are critical for CD48 binding and functional activation of NK cells. *J. Immunol.* **175**, 1005–1013 (2005).
289. **Tatsuo, H., Ono, N. & Yanagi, Y.** Morbilliviruses Use Signaling Lymphocyte Activation Molecules (CD150) as Cellular Receptors. *J. Virol.* **75**, 5842–5850 (2001).
290. **Hashiguchi, T. et al.** Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 135–142 (2011).
291. **van Driel, B. et al.** The cell surface receptor Slamf6 modulates innate immune responses during *Citrobacter rodentium* -induced colitis. *Int. Immunol.* **27**, 447–457 (2015).
292. **Roncagalli, R. et al.** Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat. Immunol.* **6**, 1002–1010 (2005).
293. **Finerty, P. J., Muhandiram, R. & Forman-Kay, J. D.** Side-chain dynamics of the SAP SH2 domain correlate with a binding hot spot and a region with conformational plasticity. *J. Mol. Biol.* **322**, 605–620 (2002).
294. **Hwang, P. M. et al.** A ‘three-pronged’ binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: Structural basis and relevance to the XLP syndrome. *EMBO J.* **21**, 314–323 (2002).
295. **Zhong, M. C. & Veillette, A.** Control of T lymphocyte signaling by Ly108, a signaling lymphocytic activation molecule family receptor implicated in autoimmunity. *J. Biol. Chem.* **283**, 19255–19264 (2008).
296. **Sidorenko, S. P. & Clark, E. A.** The dual-function CD 150 receptor subfamily: The viral attraction.

- Nat. Immunol.* **4**, 19–24 (2003).
297. **Snow, A. et al.** SAP augments proximal T cell receptor signal strength necessary for restimulation-induced apoptosis of activated T lymphocytes. *J. Clin. Investig.* **119**, 2976–2989 (2009).
 298. **Parolini, S. et al.** X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* **192**, 337–346 (2000).
 299. **Shlapatska, L. M. et al.** CD150 Association with Either the SH2-Containing Inositol Phosphatase or the SH2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Is Regulated by the Adaptor Protein SH2D1A. *J. Immunol.* **166**, 5480–5487 (2001).
 300. **Lewis, J. et al.** Distinct interactions of the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP with cytoplasmic domains of members of the CD2 receptor family. *Clin. Immunol.* **100**, 15–23 (2001).
 301. **Li, C., Iosef, C., Jia, C. Y. H., Han, V. K. M. & Li, S. S. C.** Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 3852–3859 (2003).
 302. **Chan, B. et al.** SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat. Cell Biol.* **5**, 155–160 (2003).
 303. **Latour, S. et al.** Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat. Immunol.* **2**, 681–690 (2001).
 304. **Howie, D. et al.** The role of SAP in murine CD150 (SLAM) -mediated T-cell proliferation and interferon γ production. *Blood* **100**, 2899–2907 (2002).
 305. **Mikhailap, S. V. et al.** The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* **104**, 4063–4070 (2004).
 306. **Saborit-Villarroya, I. et al.** The Adaptor Protein 3BP2 Binds Human CD244 and Links this Receptor to Vav Signaling, ERK Activation, and NK Cell Killing. *J. Immunol.* **175**, 4226–4235 (2005).
 307. **Jevremovic, D., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J. & Leibson, P. J.** Regulation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by the Adaptor Protein 3BP2. *J. Immunol.* **166**, 7219–7228 (2001).
 308. **Saborit-Villarroya, I. et al.** The adaptor 3BP2 activates CD244-mediated cytotoxicity in PKC- and SAP-dependent mechanisms. *Mol. Immunol.* **45**, 3446–3453 (2008).
 309. **Cannons, J. L. et al.** SAP regulates TH2 differentiation and PKC- θ -mediated activation of NF- κ B1. *Immunity* **21**, 693–706 (2004).
 310. **Tassi, I. & Colonna, M.** The Cytotoxicity Receptor CRACC (CS-1) Recruits EAT-2 and Activates the PI3K and Phospholipase C Signaling Pathways in Human NK Cells. *J. Immunol.* **175**, 7996–8002 (2005).
 311. **Wang, N. et al.** Cutting Edge: The Adapters EAT-2A and -2B Are Positive Regulators of CD244- and CD84-Dependent NK Cell Functions in the C57BL/6 Mouse. *J. Immunol.* **185**, 5683–5687 (2010).
 312. **Tangye, S. G., Nichols, K. E., Hare, N. J. & van de Weerd, B. C. M.** Functional Requirements for Interactions Between CD84 and Src Homology 2 Domain-Containing Proteins and Their Contribution to Human T Cell Activation. *J. Immunol.* **171**, 2485–2495 (2003).
 313. **Dupre, L. et al.** SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against. *Blood* **105**, 4383–4390 (2012).
 314. **Clarkson, N. G., Simmonds, S. J., Puklavec, M. J. & Brown, M. H.** Direct and indirect interactions of the cytoplasmic region of CD244 (2B4) in mice and humans with FYN kinase. *J. Biol. Chem.* **282**, 25385–25394 (2007).
 315. **Clarkson, N. G. & Brown, M. H.** Inhibition and activation by CD244 depends on CD2 and phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.* **284**, 24725–24734 (2009).
 316. **Moran, M. & 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* **9**, 787–796 (1998).
 317. **Ma, C. et al.** Receptor signaling lymphocyte-activation molecule family 1 (Slamf1) regulates membrane fusion and NADPH oxidase 2 (NOX2) activity by recruiting a Beclin-1/Vps34/ultraviolet radiation resistance-associated gene (UVRAG) complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 18359–18365 (2012).

318. **Bedard, K. & Krause, K. H.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
319. **Yurchenko, M. et al.** SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling in human macrophages. *J. Cell Biol.* **217**, 1411–1429 (2018).
320. **Réthi, B. et al.** SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**, 2821–9 (2006).
321. **McArdel, S. L., Terhorst, C. & Sharpe, A. H.** Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin. Immunol.* **164**, 10–20 (2016).
322. **Möller, J., Lühmann, T., Chabria, M., Hall, H. & Vogel, V.** Macrophages lift off surface-bound bacteria using a filopodium- lamellipodium hook-and-shovel mechanism. *Sci. Rep.* **3**, 1–8 (2013).
323. **Abadía-Molina, A. C. et al.** CD48 Controls T-Cell and Antigen-Presenting Cell Functions in Experimental Colitis. *Gastroenterology* **130**, 424–434 (2006).
324. **Muñoz, S., Hernández-Pando, R., Abraham, S. N. & Enciso, J. A.** Mast Cell Activation by Mycobacterium tuberculosis : Mediator Release and Role of CD48. *J. Immunol.* **170**, 5590–5596 (2003).
325. **Sintes, J., Romero, X., de Salort, J., Terhorst, C. & 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 (2010).
326. **Sugimoto, A. et al.** SLAM family member 8 is involved in oncogenic KIT-mediated signalling in human mastocytosis. *Exp. Dermatol.* **27**, 641–646 (2018).
327. **Sugimo, A., Ka, T. R., Hiroaki, I., Ki, K. & Sai, N.** SLAM family member 8 is expressed in and enhances the growth of anaplastic large cell lymphoma. *Sci. Rep.* **10**, 1–7 (2020).
328. **Zou, C. Y. et al.** Costimulatory checkpoint SLAMF8 is an independent prognosis factor in glioma. *CNS Neurosci. Ther.* **25**, 333–342 (2019).
329. **Zhang, Q. et al.** SLAMF8 expression predicts the efficacy of anti-PD1 immunotherapy in gastrointestinal cancers. *Clin. Transl. Immunol.* **10**, 1–16 (2021).
330. **Tsao, C. C. et al.** Novel Inflammasome-Based Risk Score for Predicting Survival and Efficacy to Immunotherapy in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Biomedicines* **10**, 1539 (2022).
331. **Zhang, Y. et al.** SLAMF8, a potential new immune checkpoint molecule, is associated with the prognosis of colorectal cancer. *Transl. Oncol.* **31**, 1–8 (2023).
332. **Zou, C. et al.** CD48 is a key molecule of immunomodulation affecting prognosis in glioma. *Onco. Targets. Ther.* **12**, 4181–4193 (2019).
333. **Tamura, H., Ishibashi, M., Takahashi, H. & Inokuchi, K.** SLAM family proteins as therapeutic targets in multiple myeloma. *Rinsho Ketsueki* **61**, 818–826 (2020).
334. **Li, D. et al.** SLAMF3 and SLAMF4 are immune checkpoints that constrain macrophage phagocytosis of hematopoietic tumors. *Sci. Immunol.* **7**, (2022).
335. **Lewinsky, H. et al.** CD84 is a regulator of the immunosuppressive microenvironment in multiple myeloma. *JCI Insight* **6**, 1–25 (2021).
336. **Chen, J. et al.** SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin. *Nature* **544**, 493–497 (2017).
337. **Sade-Feldman, M. et al.** Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998–1013 (2018).
338. **O’Connell, P. et al.** SLAMF7 Signaling Reprograms T Cells toward Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *J. Immunol.* **206**, 193–205 (2021).
339. **Tang, X. X., Shimada, H. & Ikegaki, N.** Macrophage-mediated anti-tumor immunity against high-risk neuroblastoma. *Genes Immun.* **23**, 129–140 (2022).
340. **Wang, S. H. et al.** Deglycosylation of SLAMF7 in breast cancers enhances phagocytosis. *Am. J. Cancer Res.* **12**, 4721–4736 (2022).
341. **Hsi, E. D. et al.** CS1, a Potential New Therapeutic Antibody Target for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2775–2785 (2008).
342. **Barros, D. I. R.** 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. (Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, 2014). doi:http://hdl.handle.net/10481/32114
343. **Raschke, W. C., Diego, S., Baird, S. & Jolla, L.** Functional Macrophage Cell Lines Transformed by

- Abelson Leukemia Virus. *Cell*. **15**, 261-267 (1978).
344. **Tsuchiya, S. et al.** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*. **176**, 171–176 (1980).
345. **Ryan, J. A.** Single Cell Cloning by Serial Dilution. *Corning Inc. Lie Sci.* 1–3 (2005).
346. **Chomczynski, P. & Sacchi, N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162(1)**, 156–159 (1987).
347. **Morón-Calvente, V. et al.** Inhibitor of apoptosis proteins, NAIP, cIAP1 and cIAP2 expression during macrophage differentiation and M1/M2 polarization. *PLoS One* **13**, 1–19 (2018).
348. **Bradford, M. M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
349. **Kricka, L. J., Voyta, J. C. & Bronstein, I.** Chemiluminescent methods for detecting and quantitating enzyme activity. *Methods Enzymol.* **305**, 370–390 (2000).
350. **Griess, P.** Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber.* **12**, 426–428 (1879).
351. **Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001)
352. **Steinberg, S. F.** Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol. Rev.* 1341–1378 (2008).
353. **Deleo, F. R. et al.** Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* **101**, 455–463 (1998).
354. **Dong, K. H. S. W. W.** High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF- κ B. *Inflamm. Res.* **61**, 1107–1116 (2012).
355. **Chessa, T. A. M. et al.** Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood* **116**, 6027–6036 (2010).
356. **Kao, Y. Y., Gianni, D., Bohl, B., Taylor, R. M. & Bokoch, G. M.** Identification of a conserved Rac-binding site on NADPH oxidases supports a direct GTPase regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**, 12736–12746 (2008).
357. **Vlahos, C., Matter, W., Brown, R., Traynor-Kaplan, A., Heyworth, P., Prossnitz, E., Ye, R., Marder, P., Schelm, J. & Rothfuss, K.** Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* **154**, 2413–2422 (1995).
358. **Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95–105 (2000).
359. **Yamazaki, T., Kawai, C., Yamauchi, A. & Kuribayashi, F.** A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Trop. Med. Health* **39**, 41–45 (2011).
360. **Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T. & Saito, T.** Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **275**, 35751–35758 (2000).
361. **Dorseuil, O., Quinn, M. T. & Bokoch, G. M.** Dissociation of Rac translocation from p47(phox)/p67(phox) movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 108–113 (1995).
362. **Gorzalczany, Y., Sigal, N., Itan, M., Lotan, O. & Pick, E.** Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 40073–40081 (2000).
363. **Laroux, F. S., Romero, X. & Wetzler, L.** Cutting Edge: MyD88 Controls Phagocyte NADPH Oxidase Function and Killing of Gram-Negative Bacteria. *J. Immunol.* **175**, 5596–5600 (2005).
364. **Taura, M. et al.** A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47 phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. J* **419**, 329–338 (2009).
365. **Jönsson, F., Gurniak, C. B., Fleischer, B., Kirfel, G. & Witke, W.** Immunological Responses and Actin Dynamics in Macrophages Are Controlled by N-Cofilin but Are Independent from ADF. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
366. **Ninkovi, J. & Roy, S.** Morphine decreases bacterial phagocytosis by inhibiting actin polymerization through cAMP-, Rac-1-, and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Am. J. Pathol.* **180**, 1068–1079 (2012).

367. **Phaire-Washington, L., Silverstein, S. C. & Wang, E.** Phorbol myristate acetate stimulates microtubule and 10-nm filament extension and lysosome redistribution in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* **86**, 641–655 (1980).
368. **Wieland, T.** The toxic peptides from Amanita mushrooms. *Int. J. Pept. Protein Res.* **22**, 257–276 (1983).
369. **Santos, R. L. et al.** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**, 1335–1344 (2001).
370. **Jouanguy, E., Doffinger, R., Dupuis, S., Pallier, A., Altare, F., & Casanova, J. L.** IL-12 and IFN- γ host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **67**, 346–351 (1999).
371. **Steele-Mortimer, O.** The Salmonella-containing vacuole-Moving with the times. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 38–45 (2008).
372. **Méresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B. B. & Gorvel, J. P.** The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J.* **18**, 4394–4403 (1999).
373. **Lathrop, S. K. et al.** Salmonella Typhimurium Infection of Human Monocyte-Derived Macrophages. *Curr. Protoc. Microbiol.* **50**, 1–24 (2018).
374. **Mattoo, S., Lee, Y. M. & Dixon, J. E.** Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 392–401 (2007).
375. **Eswarappa, S. M. et al.** Differentially evolved genes of Salmonella pathogenicity islands: Insights into the mechanism of host specificity in Salmonella. *PLoS One* **3**, (2008).
376. **Mastroeni, P. et al.** Antimicrobial actions of the nadph phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 237–247 (2000).
377. **Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. & Hensel, M.** Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* **195**, 1155–1166 (2002).
378. **Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H. & Finlay, B. B.** Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol.* **1**, 33–49. (1999).
379. **Smith, A. C. et al.** A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Cell Biol.* **176**, 263–268 (2007).
380. **Drecktrah, D., Knodler, L. A., Ireland, R. & Steele-Mortimer, O.** The mechanism of Salmonella entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* **7**, 39–51 (2006).
381. **Brawn, L. C., Hayward, R. D. & Koronakis, V.** Salmonella SPI1 Effector SipA Persists after Entry and Cooperates with a SPI2 Effector to Regulate Phagosome Maturation and Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* **1**, 63–75 (2007).
382. **Huang, F. C.** The interleukins orchestrate mucosal immune responses to salmonella infection in the intestine. *Cells* **10**, (2021).
383. **Mittrucker, H. W. & Kaufmann, S. H. E.** Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 457–463 (2000).
384. **Tam, M. A., Rydström, A., Sundquist, M. & Wick, M. J.** Early cellular responses to Salmonella infection: Dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol. Rev.* **225**, 140–162 (2008).
385. **Pinsky, M. R. et al.** Serum cytokine levels in human septic shock; Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* **103**, 565–575 (1993).
386. **Manolagas, S. C., Chrousos, G. P., Branch, E. & Health, C.** The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease. *Ann. Intern. Med.* 127–137 (1998).
387. **Jin, X., Zimmers, T. A., Zhang, Z., Pierce, R. H. & Koniaris, L. G.** Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. *Gut* **59**, 186–196 (2010).
388. **Wang, L., Srinivasan, S., Theiss, A. L., Merlin, D. & Sitaraman, S. V.** Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: Potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J. Biol. Chem.* **282**, 8219–8227 (2007).
389. **Xing, Z. et al.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **101**, 311–320 (1998).

390. **Barton, B. E. & Jackson, J. V.** Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect. Immun.* **61**, 1496–1499 (1993).
391. **Arpaia, N. et al.** TLR signaling is required for salmonella typhimurium virulence. *Cell* **144**, 675–688 (2011).
392. **Dollt, C. et al.** The novel immunoglobulin super family receptor SLAMF9 identified in TAM of murine and human melanoma influences pro-inflammatory cytokine secretion and migration. *Cell Death Dis.* **9**, 1–12 (2018).
393. **Byeon, S. E. et al.** The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* **2012**, (2012).
394. **Wiedemann, A., Rosselin, M., Mijouin, L., Bottreau, E. & Velge, P.** Involvement of c-Src tyrosine kinase upstream of class I phosphatidylinositol (PI) 3-kinases in Salmonella enteritidis Rck protein-mediated invasion. *J. Biol. Chem.* **287**, 31148–31154 (2012).
395. **Check, J. et al.** Src kinase participates in LPS-induced activation of NADPH oxidase. *Mol. Immunol.* **47**, 756–762 (2010).
396. **Chen, Y. J. et al.** Eps8 protein facilitates phagocytosis by increasing TLR4-MyD88 protein interaction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 18806–18819 (2012).
397. **Krötz, F. et al.** The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1700–1706 (2005).
398. **Chong, Z. Z. & Maiese, K.** The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: Diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol. Histopathol.* **22**, 1251–1267 (2007).
399. **Lewis, A. J., Seymour, C. W. & Rosengart, M. R.** Current Murine Models of Sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt).* **17**, 385–393 (2016).
400. **Nikolaus, T. et al.** SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J. Bacteriol.* **183**, 6036–6045 (2001).
401. **Schwan, W. R., Huang, X. Z., Hu, L. & Kopecko, D. J.** Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of Salmonella serovars within human and murine macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 1005–1013 (2000).
402. **Hölzer, S. U. & Hensel, M.** Divergent roles of salmonella pathogenicity Island 2 and metabolic traits during interaction of s. enterica serovar Typhimurium with host cells. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
403. **Alam, M. S. et al.** Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect. Immun.* **70**, 3130–3142 (2002).
404. **Lepur, A., Carlsson, M. C., Dumi, J., Nilsson, U. J. & Lef, H.** Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochem. Biophys. Acta* **1820**, 804–818 (2012).
405. **Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T. & Tredget, E. E.** Alternatively Activated Macrophages Derived from THP-1 Cells Promote the Fibrogenic Activities of Human Dermal Fibroblasts. *Wound Repair Regen.* **25**, 1–45 (2017).
406. **Mantovani, A. et al.** Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555 (2002).
407. **Van den Bossche, J. et al.** Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. *Blood* **114**, 4664–4675 (2009).
408. **Van den Bossche, J., Malissen, B., Mantovani, A., De Baetselier, P. & Van Ginderachter, J. A.** Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood* **119**, 3–5 (2012).
409. **Komander, D. et al.** Interactions of LY333531 and Other Bisindolyl Maleimide Inhibitors with PDK1. *Structure* **12**, 215–226 (2004).
410. **Canovas, B. & Nebreda, A. R.** Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 346–366 (2021).
411. **Sheats, M. K., Sung, E. J., Adler, K. B. & Jones, S. L.** In Vitro Neutrophil Migration Requires Protein Kinase C-Delta (δ -PKC)-Mediated Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) Phosphorylation. *Inflammation* **38**, 1126–1141 (2015).

412. **Ziembra, B. P., Burke, J. E., Masson, G., Williams, R. L. & Falke, J. J.** Regulation of PI3K by PKC and MARCKS: Single-Molecule Analysis of a Reconstituted Signaling Pathway. *Biophys. J.* **110**, 1811–1825 (2016).
413. **Currie, R. A. et al.** Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* **583**, 575–583 (1999).
414. **Balendran, A., Hare, G. R., Kieloch, A., Williams, M. R. & Alessi, D. R.** Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett.* **484**, 217–223 (2000).
415. **Le Good, J. A. et al.** Protein Kinase C Isoforms Controlled by Phosphoinositide 3-Kinase Through the Protein Kinase PDK1. *Science* **281**, 2042–2045 (1998).
416. **Cohen, G., Raupachova, J., Ilic, D., Werzowa, J. & Hörl, W. H.** Effect of leptin on polymorphonuclear leucocyte functions in healthy subjects and haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 2271–2281 (2011).
417. **Bouin, A. P., Grandvaux, N., Vignais, P. V. & 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.* **273**, 30097–30103 (1998).
418. **Procyk, K. J. et al.** Lipopolysaccharide induces Jun N-terminal kinase activation in macrophages by a novel Cdc42/Rac-independent pathway involving sequential activation of protein kinase C ζ and phosphatidylcholine-dependent phospholipase C. *Blood* **96**, 2592–2598 (2000).
419. **Welch, H. C. E., Coadwell, W. J., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T.** Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* **546**, 93–97 (2003).
420. **Paliga, A. J. M., Natale, D. R. & Watson, A. J.** p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) first regulates filamentous actin at the 8-16-cell stage during preimplantation development. *Biol Cell.* **97**, 629–640 (2005).
421. **Bokoch, G. M.** Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743-81 (2003).
422. **Jones, G. E.** Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 593-602 (2000).
423. **Evans, J. H. & Falke, J. J.** Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *PNAS* **104**, 16176–16181 (2007).
424. **Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H. & Fang, F. C.** Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro. *J. Exp. Med.* **19**, 227–236 (2000).
425. **Ratajczak-Wrona, W. et al.** PI3K-Akt/PKB signaling pathway in neutrophils and mononuclear cells exposed to N-nitrosodimethylamine. *J. Immunotoxicol.* **11**, 231–237 (2014).
426. **Genestra, M.** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* **19**, 1807–1819 (2007).
427. **Damascena, H., L., Silveira, A., Castro, M. S. & Fontes, W.** Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* **11**, 2889 (2022).
428. **Vazquez-torres, A. & Fang, F. C.** Salmonella evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect.* **3**, 10–12 (2001).
429. **Larock, D. L., Chaudhary, A. & Miller, S. I.** Salmonellae interactions with host processes. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 191–205 (2015).
430. **Allam, U. D. et al.** Acidic pH induced STM1485 gene is essential for intracellular replication of Salmonella. *Virulence* **3**, 122–135 (2012).
431. **Eriksson, S., Chambers, B. J. & Rhen, M.** Nitric Oxide Produced by Murine Dendritic Cells is Cytotoxic for Intracellular Salmonella enterica sv . Typhimurium. *Scand. J. Immunol.* **58**, 493–502 (2003).
432. **Claus, M., Urlaub, D., Fasbender, F. & Watzl, C.** SLAM family receptors in natural killer cells – Mediators of adhesion , activation and inhibition via cis and trans interactions. *Clin. Immunol.* **204**, 37–42 (2019).
433. **Teng, L., Shen, L., Zhao, W. & Wang, C.** SLAMF8 Participates in Acute Renal Transplant Rejection via TLR4 Pathway on Pro-Inflammatory Macrophages. *Front. Immunol.* **13**, 1–15 (2022).
434. **Zhang, Z., Shen, K., Lu, W. & Cole, P. A.** The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the

- regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J. Biol. Chem.* **278**, 4668–4674 (2003).
435. **Xiao, W., Ando, T., Wang, H. Y., Kawakami, Y. & Kawakami, T.** Lyn-and PLC- β 3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood* **116**, 6003–6013 (2010).
436. **Tsuda, M. et al.** IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *PNAS* **106**, 8032-7 (2009).
437. **Chang, Y. J., Holtzman, M. J. & Chen, C. C.** Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase C γ , c-Src, and STAT1. *Mol. Pharmacol.* **65**, 589–598 (2004).
438. **Smyth, D., Van, P., Wang, A. & McKay, D. M.** Interferon-gamma-induced increases in intestinal epithelial macromolecular permeability requires the Src kinase Fyn. *Lab. Investig.* **91**, 764–777 (2011).
439. **Meng, T. C., Fukada, T. & Tonks, N. K.** Reversible Oxidation and Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases In Vivo. *Mol. Cell* **9**, 387–399 (2002).
440. **Forman, H. J. & Torres, M.** Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* **51**, 365–371 (2001).
441. **Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A.** Beyond oxidative stress: An immunologist’s guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 349–361 (2013).
442. **Lam, G. Y., Huang, J. & Brumell, J. H.** The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin. Immunopathol.* **32**, 415–430 (2010).
443. **Coleman, J. W.** Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397–1406 (2001).
444. **Pizzino, G. et al.** Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–13 (2017).
445. **Lei, Y. et al.** Redox Regulation of Inflammation: Old Elements, a New Story. *Med. Res. Rev.* **35**, 306–40 (2015).
446. **Ramos-González, E. J., Bitzer-Quintero, O. K., Ortiz, G., Hernández-Cruz, J. J. & Ramírez-Jirano, L. J.** Relationship between inflammation and oxidative stress and its effect on multiple sclerosis. *Neurología* 1–10 (2021).
447. **Nathan, C. & Ding, A.** Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
448. **Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A.** ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol. Med.* **23**, 411–429 (2017).
449. **Huang, X., He, D., Pan, Z., Luo, G. & Deng, J.** Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation. *Mater. Today Bio.* **11**, 100124 (2021).
450. **Heider, S., Dangerfield, J. A. & Metzner, C.** Biomedical applications of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Lipid Res.* **57**, 1778-1788 (2016).
451. **Veillette, A. & Guo, H.** CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 168–177 (2013).
452. **Radhakrishnan, S. V., Bhardwaj, N., Luetkens, T. & Atanackovic, D.** Novel anti-myeloma immunotherapies targeting the SLAM family of receptors. *Oncoimmunology* **6**, (2017).

PUBLICACIÓN



SLAMF8 Downregulates Mouse Macrophage Microbicidal Mechanisms via PI3K Pathways

Salvador Romero-Pinedo¹, Domingo I. Rojas Barros¹, María José Ruiz-Magaña¹, Elena Maganto-García², Laura Moreno de Lara¹, Francisco Abadía-Molina^{3,4}, Cox Terhorst⁵ and Ana C. Abadía-Molina^{1,6*}

¹ Unidad de Inmunología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, Spain, ² Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain, ³ Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain, ⁴ Instituto de Nutrición Y Tecnología de los Alimentos “José Mataix”, (INYTIA), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, Granada, Spain, ⁵ Division of Immunology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, United States, ⁶ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Luigina Romani,
University of Perugia, Italy

Reviewed by:

Alex Braiman,
Ben-Gurion University of the Negev,
Israel
Oliver Nüsse,
Université Paris-Saclay,
France

*Correspondence:

Ana C. Abadía-Molina
acbadia@ugr.es

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 31 March 2022

Accepted: 11 May 2022

Published: 28 June 2022

Citation:

Romero-Pinedo S, Rojas-Barros DI, Ruiz-Magaña MJ, Maganto-García E, Moreno de Lara L, Abadía-Molina F, Terhorst C and Abadía-Molina AC (2022) SLAMF8 Downregulates Mouse Macrophage Microbicidal Mechanisms via PI3K Pathways. *Front. Immunol.* 13:910112. doi: 10.3389/fimmu.2022.910112

Signaling lymphocytic activation molecule family 8 (SLAMF8) is involved in the negative modulation of NADPH oxidase activation. However, the impact of SLAMF8 downregulation on macrophage functionality and the microbicide mechanism remains elusive. To study this in depth, we first analyzed NADPH oxidase activation pathways in wild-type and SLAMF8-deficient macrophages upon different stimulus. Herein, we describe increased phosphorylation of the Erk1/2 and p38 MAP kinases, as well as increased phosphorylation of NADPH oxidase subunits in SLAMF8-deficient macrophages. Furthermore, using specific inhibitors, we observed that specific PI3K inhibition decreased the differences observed between wild-type and SLAMF8-deficient macrophages, stimulated with either PMA, LPS, or *Salmonella typhimurium* infection. Consequently, SLAMF8-deficient macrophages also showed increased recruitment of small GTPases such as Rab5 and Rab7, and the p47^{phox} subunit to cytoplasmic *Salmonella*, suggesting an impairment of *Salmonella*-containing vacuole (SCV) progression in SLAMF8-deficient macrophages. Enhanced iNOS activation, NO production, and IL-6 expression were also observed in the absence of SLAMF8 upon *Salmonella* infection, either *in vivo* or *in vitro*, while overexpression of SLAMF8 in RAW264.7 macrophages showed the opposite phenotype. In addition, SLAMF8-deficient macrophages showed increased activation of Src kinases and reduced SHP-1 phosphate levels upon IFN γ and *Salmonella* stimuli in comparison to wild-type macrophages. In agreement with *in vitro* results, *Salmonella* clearance was augmented in SLAMF8-deficient mice compared to that in wild-type mice. Therefore, in conclusion, SLAMF8 intervention upon bacterial infection downregulates mouse macrophage activation, and confirmed that SLAMF8 receptor could be a potential therapeutic target for the treatment of severe or unresolved inflammatory conditions.

Keywords: SLAMF8, macrophages, SLAMF, PI3K signaling pathway, *Salmonella typhimurium*

INTRODUCTION

Receptors of the signaling lymphocyte activation molecule family (SLAMF) are adhesion molecules that are differentially expressed on hematopoietic cell membranes. These receptors are involved in the modulation of specific and innate cell functions (1, 2). The SLAM family member 8 (SLAMF8/CD353/BLAME), similar to other family members, is a type I cell surface glycoprotein containing two immunoglobulin domains (IgV and IgC2), and clusters on chromosome 1q21. Its expression is induced by different stimuli, such as bacteria and IFN γ in neutrophils, macrophages (M ϕ), and dendritic cells. Like other SLAMF receptors, SLAMF8 has been shown to be a self-ligand receptor (3). Previously, we described that SLAMF8-deficient mice (SLAMF8^{-/-}) showed enhanced protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of p40^{phox} and increased reactive oxygen species (ROS) production (3, 4). In consequence, myeloid cell adhesion and migration activity were augmented in SLAMF8-deficient mice. All these data are indicative of increased activation of macrophages in the absence of SLAMF8. However, the impact of SLAMF8 deletion in microbicidal activities has not yet been described.

The microbicidal activity of ROS produced by phagocyte NADPH oxidase (NOX2) is crucial for an effective immune response and needs to be tightly regulated to ensure innate cell functionality (5). This multiprotein complex enzyme consists of cytosolic proteins p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, the small G-protein subfamily Rac, and the associated membrane proteins gp91^{phox} and p22^{phox} (forming the flavocytochrome b₅₅₈) (5, 6). In resting cells, the cytosolic components p47^{phox}, p67^{phox}, and p40^{phox} are associated with each other, while Rac GTPase is strategically separated to avoid ROS production (7, 8). Once cells encounter a pathogen, the NOX2 subunits are activated and then recruited to membrane-bound components to produce superoxide radical anions (O₂^{-•}) (9, 10). The complete activation of NOX2 is dependent on various transduction pathways and kinases (5). Specifically, NOX2 subunits are phosphorylated on different motifs directly by PKC (11–17), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and ERK1/2 (14, 18, 19). On the other hand, the dependence of NOX2 activation on the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) pathway has been demonstrated (20), particularly through the phosphorylation of p47^{phox} by AKT and IRAK-4 (21–23). Similarly, the Rho GTPase Rac is crucial for NOX2 activation and assembly of the cytosolic components at the phagosome membrane (24), and has been shown to be dependent on p38 MAPK activation *via* the PI3K pathway (25).

Given that SLAMF8-deficient (SLAMF8^{-/-}) M ϕ showed early and significant superoxide (O₂^{-•}) production compared to wild-type (*wt* or SLAMF8^{+/+}) M ϕ , we postulated that SLAMF8 might

mediate a general primary signal modulation not only decreasing NOX2 activation through different pathways, but also downmodulating M ϕ activation and bacterial clearance. To address this question, we studied NOX2 activation pathways with different stimuli and upon *Salmonella typhimurium* infection. *S. typhimurium* is a Gram-negative facultative intracellular pathogen that is the major cause of human gastroenteritis. This pathogen is used in a mouse model of human typhoid fever (26). *S. typhimurium* is able to modify the host cell microbicidal activity by inhibiting NOX2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation, and reducing production of their derivatives (27, 28). Moreover, *S. typhimurium* also prevents phagolysosome fusion and regulates the pro-inflammatory response through translocation of effector proteins into host cells or modulating the environment by type III secretion apparatus (T3SS) (29, 30). In order to determine the implication of SLAMF8 in microbicidal mechanism, in this study, we analyze the kinase-dependent activation of NOX2, and other microbicidal mechanism in SLAMF8^{-/-} macrophages and mice. This study demonstrates the SLAMF8 modulation of macrophage activation either by agonist stimulus or during *Salmonella* infection.

MATERIALS AND METHODS

Mice

The protocol for the generation of *Slamf8*-deficient (SLAMF8^{-/-}) BALB/c mice has been described previously (4). Age- and sex-matched wild-type (*wt*) BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratories Inc. (Indianapolis, IN, USA). Mice were maintained in the animal facility (Centro de Investigación Biomédica, CIBM, and Universidad de Granada) under specific pathogen-free (SPF) conditions before use. All experimental procedures were conducted according to the RD 53/2013 (BOE, 34, 11370-11421, 2013) and the protocols were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation, University of Granada (References: CEEA-379 y CEEA-417-2012). All *in vivo* experiments were performed with good animal practices according to the guidelines of the relevant local and national animal welfare bodies.

Cells and Bacteria

Isolation of Thioglycollate-Elicited Peritoneal Macrophages and Culture Conditions

Macrophages were obtained as described previously (4). TGC peritoneal macrophages (pM ϕ) were obtained from mice after intraperitoneal (i.p.) injection with 4% Difco™ Fluid TGC Medium [Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA], and maintained in HyClone RPMI 1640 medium (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 5 mM HEPES, and 1 mM sodium pyruvate (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (complete medium) in a 95% air–5% CO₂ incubator at 37°C. For further selection, the cell suspension was incubated to allow pM ϕ to adhere to the culture

Abbreviations: CFU, colony-forming units; iNOS, inducible nitric oxide synthase; M ϕ , macrophages; MOI, multiplicity of infection; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NOX2, NADPH oxidase; O₂^{-•}, superoxide anion radical; pM ϕ , peritoneal macrophages; MIF, mean intensity of fluorescence; PAMP-R, pathogen-associated molecular pattern; ROS, reactive oxygen species; SCV, *Salmonella*-containing vacuole; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*; S, serine; T, threonine; to, time; Tyr, tyrosine; wt, wild type.

dish and then proceed with the analyses. RAW264.7 cells were maintained in DMEM (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) with 10% FBS at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. For stimulation, 1 or 0.5 × 10⁶ RAW264.7 cells or pMø, in complete medium with 0.5% FBS per well, were activated with the indicated stimuli and time points.

Bacterial Strains

Wild-type (*wt*) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*, NCTC 12023) and attenuated, resistant to ampicillin, *S. enterica* subsp. *enterica* SseB^r (MvP643, p3232) strains were grown overnight under sterile conditions in LB medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and LB with 100 µg/ml of ampicillin (Sigma-Aldrich), respectively (31). Both the bacterial strains were kindly gifted by Dr. Michael Hensel, University of Osnabrück, Germany. *Escherichia coli* F18, *S. aureus*, and GFP-tagged bacteria have been previously described (4).

Reagents

Antibodies against phospho-SHIP1 (Tyr1020), phospho-SHP-1 (Tyr564) (D11G5), phospho-Src family (Tyr416) (D49G4), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7), phospho-(Ser) PKC substrate, phospho-p40^{phox} (Thr154), and Rac1/2/3 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Phospho-ERK (E-4), p38α/β MAPK (H-147), p47^{phox} (H-195), p22^{phox} (C-17), Rab5 (D-11), Rab7 (H-50), calnexin (H-70), c-Myc (9E10), and COX-2 (C-20) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). The iNOS/NOS type II (54/iNOS) antibody was purchased from BD Biosciences, and the β-actin (AC-15) antibody was purchased from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies for Western blotting, ECLTM anti-rabbit, and anti-mouse IgG HRP were obtained from GE Healthcare. For immunofluorescence and confocal laser microscopy, Alexa Fluor[®]488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor[®]488 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor[®]488 donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor[®]594 goat anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor[®]647 donkey anti-mouse IgG were obtained from Invitrogen. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and pure lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O111:B4 (L3024) were purchased from Sigma-Aldrich. The inhibitors, bisindolylmaleimide I (BIM-1), SB203580, and LY294992 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Cell Transfections

Overexpression of mouse SLAMF8 in RAW264.7 cells. Full-length mouse *Slamf8* cloned in pCMV6 (C-terminal Myc-DDK-tagged, MR203747) was purchased from OrigeneTM (Rockville, MD, USA). For stable transfection, 10⁶ RAW264.7 cells were electroporated with 1 µg of vector using NucleofectorTM Amaxa[®] (Cologne Nordrhein-Westfalen, Germany) (program D-032) according to the manufacturer's instructions. Transient and stable *Slamf8*-RAW264.7 cells were cultured in complete medium with G-418. Then, *Slamf8* overexpression was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting, and immunofluorescence. For

Western blotting and immunofluorescence analyses, anti-c-Myc (9E10) antibody was used to detect the expression of the Myc-tag situated at the C-terminal position of mouse SLAMF8.

Cell Treatments

Mø (1 or 0.5 × 10⁶ per well) were stimulated with 100 ng/ml PMA or 10 µg/ml LPS at the indicated time points. For inhibition of kinases, Mø were pretreated with 5 µM BIM-1, 10 µM SB203580, or 10 µM LY294992 for 1 h and then activated with the indicated stimuli at the indicated time points. *In vitro infection model with S. typhimurium*: Mø were incubated with 100 U/ml IFNγ for 16 h prior to infection. Then, the cells were pulsed with wild-type (*wt*) *S. typhimurium* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 and analyzed at different times post-infection. After pulse time, cells were washed with complete medium, supplemented with 10 µg/ml gentamicin (Sigma-Aldrich), and incubated for the corresponding times in order to kill extracellular bacteria. Subsequently, the cells were washed with cold PBS and lysed in appropriate lysis buffer to obtain the total extract.

Western Blotting

For total extracts, after experimental treatments, Mø were washed with cold PBS and lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) (Sigma-Aldrich), 140 mM NaCl (Scharlau), 2 mM EDTA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 1% NP40 (Thermo Scientific), 10 mM iodoacetamide, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 50 µM phenylarsine oxide, 50 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (all from Sigma-Aldrich), and 1× of protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) for 30 min at 4°C.

Immunoblotting

All the extracts were resolved by SDS-PAGE, blotted, and probed with the indicated antibodies. Protein detection was carried out by chemiluminescence using ECL-Plus (Amersham, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, and protein bands were quantified by densitometry using Multi-Gauge software (V3.0, Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan). The relative expression was normalized to the loading control.

Extraction of Cytosolic and Membrane Proteins

Mø were washed with cold PBS and lysed in buffer containing 100 mM HEPES (pH 7.3) (Sigma-Aldrich), 100 mM KCl (Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spain), 3 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 1.25 mM EGTA (Merck), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich), and 1× of protease inhibitor cocktail (Roche) for 30 min at 4°C. Then, the cells were sonicated, and non-lysed cells and debris were removed by centrifugation at 10,000 × g for 5 min at 4°C. Subsequently, the supernatants constituting the cytosolic fraction were further ultracentrifuged at 100,000 × g for 30 min at 4°C on an OptimaTM MAX ultracentrifuge (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) using a TLA-110 fixed angle rotor. The pellet was resuspended in a buffer containing 120 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4) (Merck), 1 mM MgCl₂ (Scharlau), 1 mM EGTA (Merck), 1 mM dithiothreitol, 20% (v/v) glycerol, 40 mM

octylglucoside (all from Sigma-Aldrich), and 1× of protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche) and then recentrifuged at 20,000 × g for 40 min at 4°C to obtain the membrane fraction.

Confocal Microscopy

Staining of F-Actin by Phalloidin-TRITC

Mø were plated on chamber slides (Thermo Scientific Nunc Lab-Tek). After experimental treatments, cells were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde (PDF) for 10 min at 4°C and subsequently with BD Cytfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min. After three washes with 0.05% PBS-saponin (Merck), cells were incubated with 5 µg/ml of phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich) in 0.05% PBS-saponin for 40 min at 4°C in the dark. Slides were washed twice with 0.02% PBS-saponin and then with PBS.

p47^{phox} and p22^{phox} Staining Analysis by Confocal Microscopy

pMø fixed with 2% PFD were washed three times with 0.1% PBS-Tween (Sigma-Aldrich) and incubated for 30 min on ice with 0.1% PBS-Tween20 containing purified rat anti-mouse CD16/CD32 antibody (BD Biosciences) at a dilution of 1:200 and 5% goat serum for p47^{phox} or 5% donkey serum for p22^{phox} staining, to block Fcγ receptors. After three washes with 0.1% PBS-Tween-20, the cells were incubated with α-p47^{phox} (H-195) or α-p22^{phox} (C-17) at a dilution of 1:100 in 0.1% PBS-Tween-20 containing 1% BSA. After 2 h of incubation, the cells were washed three times with 0.1% PBS-Tween-20 and incubated for 1 h in the dark with 0.1% PBS-Tween-20 containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 1:1,000 dilution of Alexa Fluor[®]488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific) for p47^{phox} or Alexa Fluor[®]488 donkey anti-goat IgG (Invitrogen) for p22^{phox} staining. Slides were then washed twice with 0.1% PBS-Tween-20 followed by last wash with PBS. Finally, all the coverslips were mounted with DAPI-mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Confocal microscopy was performed using an oil immersion 60× objective on the Nikon A1 microscope. The mean fluorescence intensity (MFI) was measured as the mean gray value of the maximum projection using ImageJ software.

Phagocytic Uptake Analysis by Confocal Microscopy

pMø were plated on chamber slides (Nunc) and incubated with 100 U/ml IFNγ 16 h prior to infection. Then, the cells were infected at an MOI of 10 with *wt S. typhimurium* strain that expressed GFP at different pulse times. After experimental treatments, the cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min at 4°C, and subsequently with BD Cytfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min. After three washes with 0.05% PBS-saponin (Merck), cells were incubated with 5 µg/ml of phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich) in 0.05% PBS-saponin for 40 min at 4°C in the dark. Slides were washed twice with 0.02% PBS-saponin followed by last wash with PBS. Finally, all the coverslips were mounted with DAPI-mounting medium (Vector Laboratories). Confocal microscopy

was performed using a 60× objective on the Nikon A1 microscope. Orthogonal views were used to analyze the bacterial uptake, the percentage of macrophages infected, and the number of *S. typhimurium*-GFP per macrophage.

Colocalization Analysis of *S. typhimurium*-GFP by Confocal Microscopy

pMø (1.5×10^5 cells per well) were infected with wild-type *S. typhimurium*-GFP (MOI 10) at different pulse/chase times. The cells were then washed with complete medium supplemented with 10 µg/ml gentamicin (Sigma-Aldrich) to kill extracellular bacteria and incubated for the indicated chase times. After the experimental treatments, cells were washed and fixed as described above. After washing, pMø were incubated for 30 min with 0.1% PBS-Tween-20 containing 5% donkey serum (Sigma-Aldrich) and purified rat anti-mouse CD16/CD32 on ice to block Fcγ receptors.

Rab5 and Rab7 Staining

Cells were washed three times with 0.1% PBS-Tween-20 and incubated with α-Rab5 (D-11) and α-Rab7 (H-50) at a dilution of 1:100 in 0.1% PBS-Tween-20 containing 1% BSA for 2 h, and then washed and incubated with Alexa Fluor[®]647 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) and Alexa Fluor[®]594 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) at a dilution of 1:1,000 for 1 h in the dark.

p47^{phox} Staining

Washed cells were incubated with α-p47^{phox} (H-195) at a dilution of 1:100 in PBS-Tween-20 BSA for 2 h, washed three times, and incubated with Alexa Fluor[®]594 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) at a dilution of 1:1,000 in PBS-Tween-20 BSA for 1 h in the dark. All the slides were then washed twice with 0.1% PBS-Tween-20 followed by last wash with PBS. Finally, all the coverslips were mounted with DAPI-mounting medium (Vector Laboratories). Confocal microscopy was performed using a 60× objective on the Nikon A1 microscope and the colocalization was determined using the Pearson's correlation coefficient of established regions of interest (ROIs) in z-stacks containing *S. typhimurium*-GFP and analyzed using NIS-Elements AR Analysis software (Nikon instrument Inc, Melville, NY, USA).

In Vivo Infection With *S. typhimurium*

Mice were injected i.p. with *wt* and *SseB*⁻ *Salmonella* strains (5×10^4 CFUs in 200 µl of PBS) and were sacrificed 48 h after infection. Peritoneal cells, obtained by peritoneal lavage, and spleen homogenates were lysed in appropriate lysis buffer to obtain total extracts. Then, the proteins were resolved by SDS-PAGE, blotted, probed with the respective antibodies, and analyzed as described above. For *in vivo* killing of *S. typhimurium*, mice were injected i.p. with the same amount of *wt S. typhimurium* and *SseB*⁻ (5×10^4 CFUs in 200 µl of PBS) and were sacrificed 48 h after infection. Different dilutions of organ homogenates were cultured on LB plates with and without ampicillin (100 µg/ml) overnight at 37°C. The next day, total colony-forming units (CFUs) were calculated. The CFUs from *wt*

S. typhimurium were calculated from the difference in CFUs in plates without ampicillin and CFUs in plates with ampicillin.

Determination of ROS Production

pM ϕ were plated in a 96-well plate and pretreated with or without the inhibitors, and 150 μ M of lucigenin (Santa Cruz Biotechnology) in Hepes-buffered Krebs-Ringer (KR-Hepes), composed of 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM H₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 1.25 mM CaCl₂, 10 mM glucose, and 25 mM Hepes (pH 7.4) at 37°C for 1 h. Then, the cells were exposed to 100 ng/ml PMA, 10 μ g/ml LPS, or *S. typhimurium* (MOI 10) and the chemiluminescence emission was measured at different times using the Synergy™ Neo2 hybrid multi-mode reader (BioTek, by Agilent, Santa Clara, CA, USA) and analyzed using the BioTek Gen5™ software. ROS production (NOX2 activity) was calculated as the increment of chemiluminescence over the value at t₀ (before adding the activator agents).

RT-PCR and Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

After experimental treatments, total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA per sample was reverse transcribed into cDNA using the Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's specifications. For overexpression of *Slamf8* in RAW264.7 cells, full-length mouse *Slamf8* primers were used (Table 1). The relative mRNA expression levels were determined by the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method, using the primer pairs for mouse as indicated in Table 1, by quantitative RT-PCR using FastStart SYBR Green Master mix (Roche) on the Quantica Real-Time PCR Thermal Cycler (Techne, Stone, Staffordshire, UK). Gene expression was normalized to the basal expression levels and graphically represented.

Determination of NO Production

NO production was determined by measuring the concentration of NO₂⁻ in the culture medium using the Griess reaction. Upon complete activation, the supernatants were collected and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 4°C in a microfuge to remove the cellular debris, and then incubated with the Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylene-diaminedihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) at room temperature for 30 min in the dark. The concentration of NO⁻ was calculated by comparison with the absorbance at 540 nm of standard solutions of 0–100 μ M sodium nitrite in the appropriate

culture media, using the Synergy™ Neo2 multi-mode reader (BioTek®) and analyzed using the BioTek Gen5™ software.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined by Student's *t*-test (two-tailed distribution with a two-sample equal variance) and one-way ANOVA with Tukey's post-hoc analysis. The *p*-values were considered significant when they were below 0.05.

RESULTS

Enhanced Phosphorylation of NOX2 Subunits p47^{phox} and p40^{phox} via PKC, and MAPK ERK1/2 and p38 Activation in SLAMF8^{-/-} Macrophages

We previously reported that SLAMF8^{-/-} M ϕ showed increased O₂⁻ production due to increased PKC activity and phosphorylation of threonine 154 (T154) in p40^{phox} upon bacterial and PMA, PKC agonist, stimulation (3, 4). Therefore, we postulated that SLAMF8 might modulate different NOX2 activation pathways (5). To test the hypothesis, primary peritoneal M ϕ (pM ϕ) isolated from wild-type (*wt*) and SLAMF8^{-/-} mice were incubated with IFN γ and 0.5% FBS overnight, and then infected with *E. coli* *in vitro*. We analyzed the phosphorylation of ERK1/2 (p-pERK1/2) and p38 (p-p38) MAPK due to their involvement in NOX2 activation (14). In addition, the phosphorylation of p40^{phox} (p-p40^{phox}) on T154 and the phospho-serine PKC substrate of subunits p47^{phox} (p-p47^{phox}) and p40^{phox} were also analyzed by Western blotting (32). As expected, SLAMF8^{-/-} pM ϕ showed statistically significantly enhanced phosphorylation of the analyzed proteins compared to *wt* pM ϕ (Figures 1A, B). We must emphasize that bone marrow-derived M ϕ or unprocessed pM ϕ obtained by TGC showed a similar phenotype, so we used the latter in our assays (Figure S1) (4).

Next, to examine direct and indirect PKC activation, pM ϕ were stimulated with PMA or pure LPS (<1% RNA and protein, Sigma-Aldrich) (22, 33, 34). SLAMF8^{-/-} pM ϕ stimulated with PMA showed statistically significantly greater phosphorylation of p-p47^{phox} and p-p40^{phox} than *wt* pM ϕ (Figures 1C, D). Stimulation with LPS showed statistically significantly greater phosphorylation of p-p40^{phox} (T) than *wt* pM ϕ . Similarly, p-p38 and p-ERK1/2 MAPK were significantly increased in SLAMF8^{-/-} pM ϕ compared to *wt* pM ϕ , stimulated with either LPS or PMA

TABLE 1 | Primers.

GEN	Forward	Reverse
TLR-4	GGGAGGCACATCTTCTGGAG	CCT CTG TTT GCT CAG
TLR-2	GGAGGTTGCATATCCCCCAG	GAG CAG GGA ACC AGG AAG AC
TLR-6	GTCAGTGGACACAGACCAGG	ACC CAG GCA GAA TCA TGC TC
SLAMF9	CCCATGAAGGCTCTGTCTCTC	ACC CAG GCA GAA TCA TGC TC
SLAMF8-full length	ATGTGGTCCCTCTGGAGTCTTCTTC	CTATACGAGGGCATTCTCTGTCTCTGG
HTRPT1	CAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGGA	TGACACTGGCAAACAATGCA
SLAMF8 (RT-PCR)	ATGTGGTCCCTCTGGAGTCTTCTTC	GTACACCTTGGCTGGAGGGGT

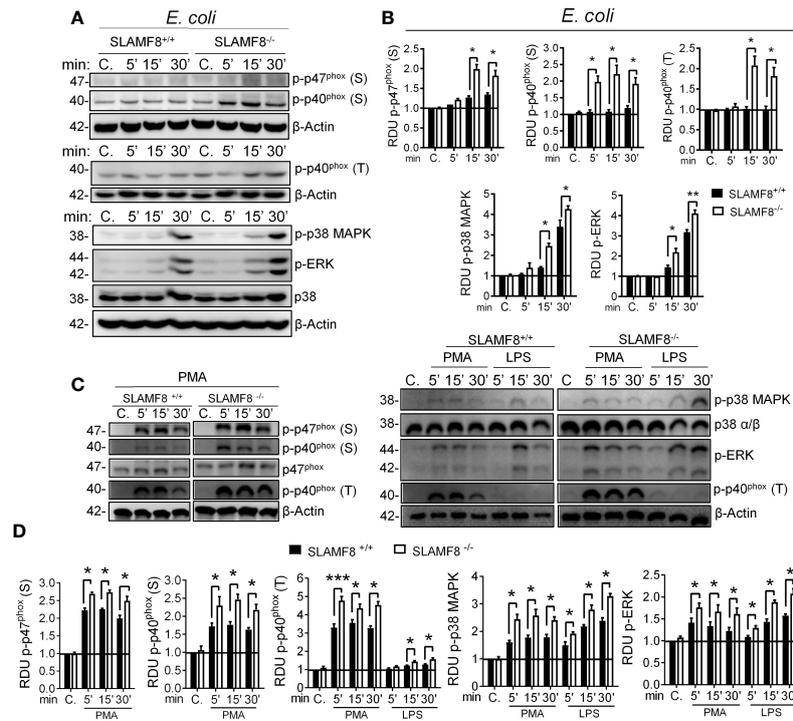


FIGURE 1 | SLAMF8^{-/-} pMø show increased activation of NOX2 subunits and MAPK upon stimulation with bacteria or an agonist. Analysis of phosphorylated p47^{phox} and p40^{phox} NOX2 subunits, as well as ERK1/2 and p38 MAPK in *wt* and SLAMF8^{-/-} pMø upon stimulation with *E. coli* (MOI 10), 100 ng/ml PMA, or 10 μg/ml pure LPS at different time points. **(A, C)** Representative Western blots of the analyzed proteins in pMø upon stimulation with *E. coli*, PMA, or LPS. Results of one out of three independent experiments is shown. **(B, D)** Relative expression levels of phosphorylated proteins as indicated in A and C. Relative phosphorylation levels were normalized to appropriate loading control and are graphically represented. Values indicate mean ± SEM of three independent experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. C, control; S, serine; T, threonine; RDU, relative densitometry units.

(**Figures 1C, D**). Thus, SLAMF8 downmodulates not only PKC activation, but also the MAPK pathway. Considering these results, we hypothesized an increase in the mobilization of NOX2 cytosolic subunits toward the membrane in the absence of SLAMF8 in Mø, which was analyzed next.

Enhanced Rac GTPase Mobilization and NOX2 Subunit Assembly to the Membrane in SLAMF8^{-/-} Macrophages

To analyze the activation of the small Rho GTPases Rac, we performed Western blotting using cytosolic and membrane extracts from *wt* and SLAMF8^{-/-} pMø treated with PMA. Increased amounts of Rac GTPase subunit were observed in the cell membrane extracts of SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø (**Figure 2**). These differences were not due to the higher amount of total protein in SLAMF8^{-/-} pMø, since no differences were observed in whole protein extracts between the samples. On the other hand, cytosolic extracts show an inferior amount of the analyzed proteins in SLAMF8^{-/-} compared to *wt* pMø. An increased amount of p-p47^{phox} and p-p40^{phox} subunits was also observed in cell membrane extracts of SLAMF8^{-/-} pMø compared to their *wt* counterparts, which indicates a greater assembly of these two subunits at the cellular membrane compartments (32, 35) To verify this, we analyzed the MFI of

anti-p47^{phox} and anti-p22^{phox} in pMø activated with PMA by confocal microscopy (**Figure 3**). These experiments showed higher MFI of p47^{phox} and p22^{phox} in SLAMF8^{-/-} than in *wt* pMø. Differences were statistically significant between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMø (**Figures 3A, B**). All these data support the hypothesis that SLAMF8 modulates the PI3K and p38 MAPK, as Rac-GTP and NOX2 subunit assembly was reported to be regulated through these pathways (20, 25).

SLAMF8^{-/-} Macrophages Show Increased PI3K-Dependent NOX2 Activation

To consistently verify SLAMF8 downregulation in the different pathways, we analyzed ROS production and signal transduction in pMø treated with PMA, and pure LPS, to analyze PI3K activation, following exposure to specific inhibitors. For that, cells were pretreated with the PKC inhibitor bisindolylmaleimide I (BIM-1, 1.5 μM), selective p38 MAPK inhibitor SB203580 (10 μM), or the PI3K inhibitor LY294002 (10 μM) before stimulation as described (14, 24, 36, 37). Pretreatment with BIM-1 completely inhibited the production of O₂^{-•} when pMø were activated with PMA in both types of cells (**Figure 4A**), and little or none of the phosphorylated proteins analyzed were observed (**Figure S2**). This result agrees with the broader inhibition of PKCs and other kinases with this inhibitor (38).

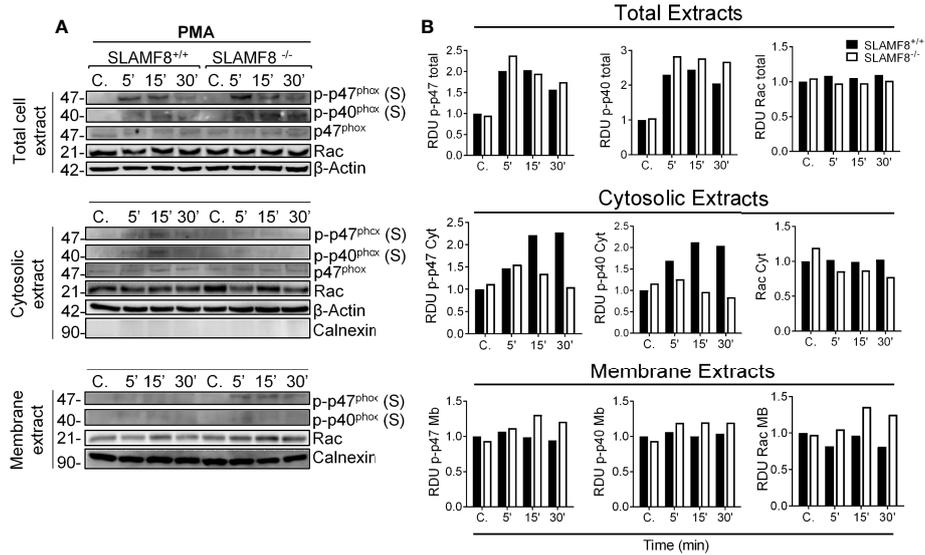


FIGURE 2 | SLAMF8^{-/-} pMφ show increased mobilization of cytosolic NOX2 subunits to the membrane. Analysis of Rac GTPase, p-p47^{phox}, and p-p40^{phox} mobilization in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ stimulated with PMA (100 ng/ml). **(A)** Representative Western blots of total cell, cytosolic, and membrane extracts from SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ treated with PMA at different time points. Absence and presence of Calnexin indicated purity of cytosolic and membrane extracts, respectively. **(B)** Relative expression levels of proteins indicated in A, representative data of one out of two independent experiments. C, control; S, serine; T, threonine; RDU, relative densitometry units.

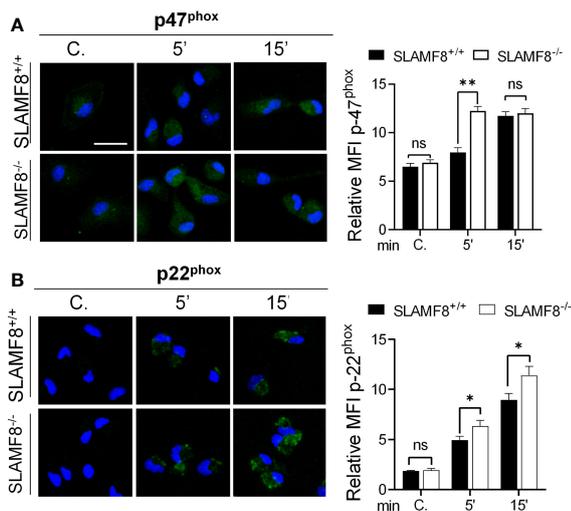


FIGURE 3 | Increased fluorescence intensity staining of p47^{phox} and p22^{phox} in SLAMF8^{-/-} pMφ indicates enhanced NOX subunit assembly compared to SLAMF8^{+/+} pMφ. Immunofluorescence analysis of p47^{phox} and p22^{phox} in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ activated with PMA and stained with the indicated antibody. Representative images of pMφ treated with PMA at different time points and stained with α-p47^{phox} **(A)** or α-p22^{phox} **(B)** (green). Cell nuclei were stained with DAPI, and the samples were analyzed by confocal microscopy. Scale bar: 20 μm. The mean fluorescence intensity (MFI) was measured as mean gray value (MFI) of maximum projection images and is graphically represented. Values indicate mean (maximum projection) ± SEM (n = 50 stochastic cells per coverslip). Results of one representative experiment out of two independent experiments are shown. *p < 0.05; **p < 0.001. C, control. ns, Not Significant.

As previously described, pretreatment with the p38 MAPK inhibitor SB203580 significantly reduced O₂^{-•} production in PMA-activated pMφ, although SLAMF8^{-/-} pMφ showed a statistically significantly increased O₂^{-•} production compared to wt pMφ (**Figure 4A**). Accordingly, the phosphorylation of p38 MAPK was reduced in both types of cells (19, 24), but continued to be statistically greater in SLAMF8^{-/-} pMφ than in wt pMφ at each time point of stimulation (**Figures 4B** and **S2**). Noticeably, the p-p40^{phox} on S was significantly reduced in SLAMF8^{-/-} pMφ and became equivalent to the p-p40^{phox} on S in wt pMφ (**Figures 4B** and **S2**), suggesting the SLAMF8 modulation of p38 MAPK activation. These results also suggested that p38 MAPK is directly involved in this subunit activation upon PMA treatment (not previously documented).

Activation of NOX2, dependent on the PI3K, was analyzed by pretreatment of cells with LY294002 (10 mM), which, as described (23, 36), reduced ROS production almost to basal levels (**Figure 4A**). Inhibition of PI3K not only reduced the phosphorylation of all the analyzed proteins in both types of cells, but unexpectedly decreased the observed differences between SLAMF8^{-/-} and wt pMφ stimulated with PMA (**Figure 4C**). All these results highlight that intervention of SLAMF8 in the PI3K pathway modulates the activation of the majority of NOX2 subunits.

To confirm the increased activation of the PI3K pathway in SLAMF8^{-/-} pMφ, we analyzed pure LPS stimulation in SLAMF8^{-/-} and wt pMφ pretreated with the specific inhibitors as mentioned previously (39). Pretreatment with LY294002 showed reduced phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, and p-p40^{phox} on T154 in both types of LPS-treated cells. No

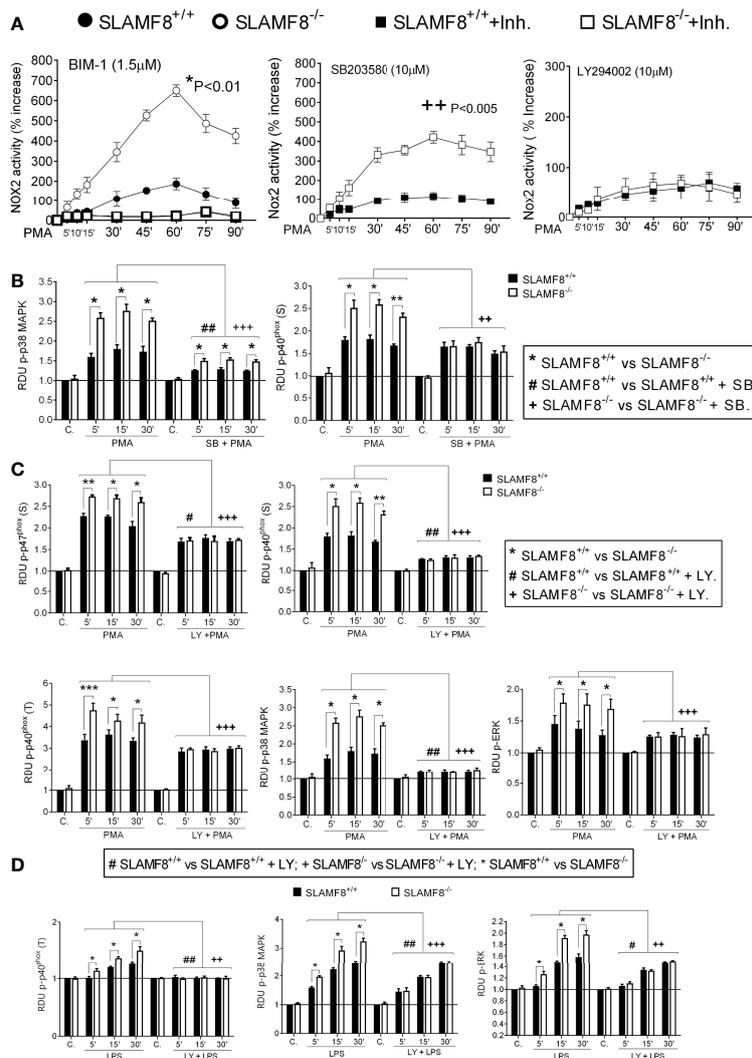


FIGURE 4 | Study of ROS production and activation of NOX2 subunits in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ pretreated with inhibitors and stimulated with PMA or LPS. pMφ were pretreated with or without 5 μM bisindolylmaleimide I (BIM1), 10 μM SB203580 (SB), or 10 μM LY294002 (Ly) for 1 h, and stimulated with 100 ng/ml PMA (**B**, **C**) or 10 μg/ml LPS (**C**) at different time points. (**A**) Analysis of ROS production monitored through lucigenin-luminescence assay, calculated as percentage increase over t_0 . Values indicate mean \pm SEM. * Differences between SLAMF8^{+/+} pMφ vs. SLAMF8^{-/-} pMφ; + Differences between SLAMF8^{+/+} vs. SLAMF8^{-/-} samples treated with the indicated inhibitor. (**B–D**) The graphs show the relative expression levels of the indicated proteins, as analyzed by Western blotting (**Figures S2, S3**), in pMφ stimulated with PMA (**B**, **C**) or LPS (**D**). Levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} pMφ vs. SLAMF8^{-/-} pMφ at each time point, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # indicates differences between SLAMF8^{+/+} pMφ vs. SLAMF8^{-/-} pMφ treated with inhibitors. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; * indicates differences between SLAMF8^{-/-} pMφ vs. SLAMF8^{-/-} pMφ treated with inhibitors, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Values indicate mean \pm SEM of three independent experiments. C, Control; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, threonine.

differences in the phosphorylated proteins analyzed were observed between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMφ (**Figures 4D** and **S3**). These results demonstrate that SLAMF8 negatively modulates NOX2 and Mφ activation through the PI3K pathway.

Increased NOX2 and iNOS Activation in *Salmonella*-infected SLAMF8^{-/-} Macrophages

S. enterica serovar *typhimurium* (*wt S. typhimurium*) virulence is associated with its invasive capacity and suppression of the

innate immune system. This bacterium is used as a model of typhi fibers and gastroenteritis *in vivo* and *in vitro* (26). Since IFN γ increases SLAMF8 expression (3, 4), and activation of pMφ through IFN γ is crucial for *Salmonella* infection (40), we decided to analyze the impact of SLAMF8 in *Salmonella*-infected Mφ. To emulate the infectious context, we treated pMφ with IFN γ before *in vitro* stimulation. To follow *Salmonella*-containing vacuole (SCV) biogenesis, analyses *in vitro* were performed at early (<30 min post-infection), intermediate (30 min to 5 h), and late SCV stages (>5 h post-infection), at which point replication

is initiated (41–43). In these experiments, pMø were pulsed for 15 min with *S. typhimurium*, and then samples were analyzed at the indicated times post-infection using the gentamicin protection assay (*Materials and Methods*). As observed with *E. coli*, SLAMF8^{-/-} pMø challenged with *S. typhimurium* (MOI 10) exhibited greater activation of NOX2 subunits, p-p40^{phox} on T154 and p-p47^{phox} on S, as well as phosphorylation of the kinases p38 MAPK and ERK1/2, than *wt* pMø (**Figures 5 and S4**). The differences between samples were statistically significant. Note that, enhanced protein activation in SLAMF8^{-/-} pMø was not due to increased phagocytosis (**Figure S5**). We also performed

analyses using specific inhibitors. Pretreatment of pMø with BIM-1 only partially reduced the phosphorylation of p47^{phox} (S), p38, and ERK1/2 MAPK, and inhibited the phosphorylation of p40^{phox} on T154 upon *S. typhimurium* stimulation, either in *wt* or in SLAMF8^{-/-} pMø (**Figures 5A, B**). Nonetheless, SLAMF8^{-/-} pMø still showed statistically significantly greater phosphorylation of all these proteins than *wt* pMø. We did not observe complete inhibition with BIM-1, possibly due to stimulation by several pathogen-associated molecular pattern receptors (PAMP-Rs) and pathways when Mø experienced whole bacterial stimulus, in contrast to chemical agonist treatment (**Figures S2, S3**). In fact,

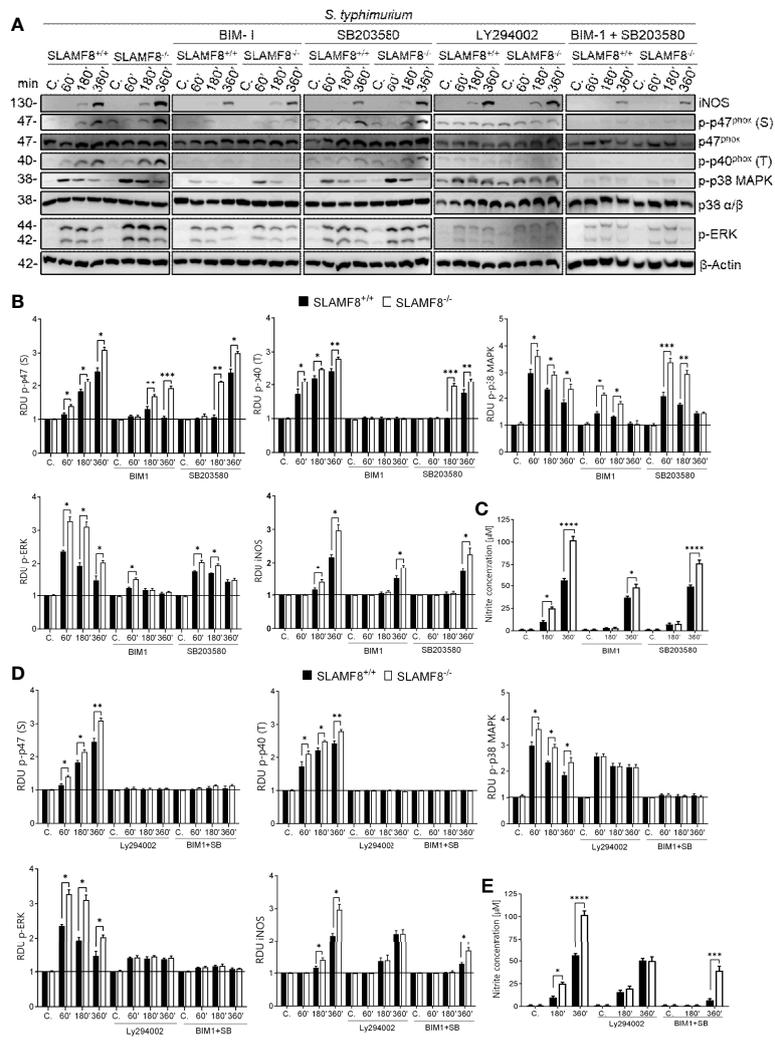


FIGURE 5 | Analyses of activation of NOX2 subunits, ERK1/2, and p38 MAPK in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMø upon infection *in vitro* with *S. typhimurium*, and determination of NO production. pMø were pretreated with or without 5 μM bisindolylmaleimide I (BIM1), 10 μM SB203580 (SB), or 10 μM LY294002 (Ly) for 1 h, and then infected with *S. typhimurium* (MOI 10) at different chase times. **(A)** Representative Western blots of indicated protein lysates. Results of one out of three independent experiments are shown. **(B, D)** Relative expression of phosphorylated proteins indicated in A; levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} vs. SLAMF8^{-/-} cells at each time point, **p* < 0.05; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. **(C, E)** Analysis of NO production in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMø infected with *S. typhimurium*. Histogram shows nitrite concentration [μM] as determined by the Griess reaction. Values indicate mean ± SEM. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} vs. SLAMF8^{-/-} cells at each time point, **p* < 0.05; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. C, control; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

treatment with SB203580 partially reduced the phosphorylation of the analyzed proteins (Figures 5A, B), while the combined pretreatment with SB203580 and BIM-1 abolished NOX2 activation and signals in both types of cells (Figures 5A, D). Interestingly, as observed when using an agonist stimulus, pMø pretreatment with LY294002 and *S. typhimurium* showed reduced phosphorylation of the analyzed proteins and reduced the differences between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMø (Figures 5A, D).

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a key microbicidal mechanism involved in the clearance of *Salmonella* at later stages of infection and is dependent on phagolysosome formation (44, 45). Stimulation with *S. typhimurium* showed greater induction of iNOS (Figures 5A, B) and therefore a higher production of NO in SLAMF8^{-/-} pMø than in *wt* pMø (Figure 5C). Treatment with the PI3K inhibitor eliminated the differences between samples, either in iNOS expression (Figures 5A, B) or in the production of NO (Figure 5D). Pretreatment with BIM-1 and or SB203580 partially reduced iNOS and NO production, although there were still differences between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMø (Figures 5C, E). These results confirmed the relevance of SLAMF8 in PI3K pathway activation in mouse Mø during *S. typhimurium* infection. Given these results, we analyzed whether SCV progression in SLAMF8^{-/-} pMø was impaired.

Enhanced Recruitment of the Small GTPases Rab5 and Rab7, as Well as the p47^{phox} Subunit to *Salmonella* in SLAMF8^{-/-} Macrophages

The maturation of SCV involves a continuous and dynamic interaction with the host endosomal system (46, 47). Given the previous results, we postulated that SLAMF8 might modulate SCV maturation and progression. To examine the levels of maturation markers in SLAMF8^{-/-} Mø compared to *wt* Mø, we analyzed the early to intermediate stages of SCV progression by confocal microscopy. Early SCVs (<30 min) were determined by the presence of the small GTPase Rab5 (47), and late SCVs were determined with GTPase Rab7 (>30 min) (48). Colocalization of GFP-*Salmonella* with these proteins was analyzed in z-stacks and calculated using Pearson's correlation coefficient (41, 49). As shown in Figure 6, we observed significantly increased recruitment of Rab5 or Rab7 towards green-*Salmonella* in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø. This observation was not due to greater phagocytosis, as evaluated by confocal microscopy, and there were no differences between *wt* and SLAMF8^{-/-} pMø samples, neither in the percentage of Mø infected, nor in the percentage of Mø with different number of *S. typhimurium* per cell (Figures S5B, C). These results suggested that in the absence of SLAMF8, the Mø exhibit increased phagosome-lysosome fusion (50).

On the other hand, to corroborate greater activation of NOX2 upon SCV, we analyzed p47^{phox} localization in GFP-*Salmonella* in pMø by confocal microscopy (35). Analyses were also performed in z-stacks and using Pearson's correlation coefficient. We observed statistically significantly enhanced approximation of p47^{phox} to GFP-*Salmonella* in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø (Figures 6B, E). This result

corroborated the increase in NOX2 activation over *Salmonella*, and suggests an increased SCV progression in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt*, similar to the results observed upon stimulation with agonist PMA.

Activation of SLAMF8^{-/-} Macrophages With IFN γ and *S. typhimurium* Shows Increased Expression of IL-6 Production, But No Differences in TLRs or SLAMF9

Recently, Zeng et al. (51) showed that the combined interaction of SLAMF9 and SLAMF8 modulates the response to LPS through TLR4 receptor in mice. To evaluate whether SLAMF8 can modulate the expression of TLR4 and SLAMF9 and, therefore, influence the observed phenotype in SLAMF8-deficient mice, we analyzed their expression in pMø by RT-PCR after treatment with IFN γ (100 U/ml for 16 h) and infection with *S. typhimurium* at different time points (Figure 7). The expression of *tlr4* was only significantly greater at a pulse chase of 15/60 min post-stimulus in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø, whereas no differences were observed in the expression of *Slamf9* during the experimental time points. Analyses of *tlr2* and *tlr6* showed similar results (Figure S6). On the other hand, and in consonance with increased PI3K signal, the IL-6 expression in pMø stimulated with IFN γ plus *Salmonella* *in vitro* was higher in SLAMF8^{-/-} pMø than in *wt* pMø (Figure 7). These results indicate that signal transduction and inflammatory response during *S. typhimurium* infection are modulated by SLAMF8 in mouse Mø.

SLAMF8^{-/-} Macrophages Show Increased Src Kinase Activation and Reduced SHP-1 Phosphorylation Upon IFN γ and *Salmonella* Stimuli

The activation of innate cells occurs through distinct Src kinases, which are also defined as integrators of different signaling pathways in Mø that experience an external stimulus (52). *Salmonella* infection has been shown to induce Src kinase activation during internalization (53). Therefore, we analyzed Src kinase activation in resting and treated pMø. Evaluation of Src kinase activity showed a statistically significant increase in the phosphorylation of Tyr416 in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø treated with IFN γ (16 h) *in vitro* (Figures 8A, B). However, there were no differences in the phosphorylation levels of the other proteins analyzed, e.g., Erk1/2 kinase (Figures 8A, B) and others (Figure S7). Exposure to *S. typhimurium* significantly increased the differences in the phosphorylation of Src on Tyr416 between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMø (Figures 8C, D). Alternatively, cytosolic protein tyrosine phosphatases (PTPs) have been defined as keepers of Mø activation, and SHP-1 has been specifically implicated in the negative regulation of superoxide production by NOX2 through the PI3K-Rac GTPase signaling pathway (54, 55). Statistically significantly decreased phosphorylation of SHP-1 on Tyr564 was detected in SLAMF8^{-/-} pMø compared to *wt* pMø treated with IFN γ and *S. typhimurium* (Figures 8C, D).

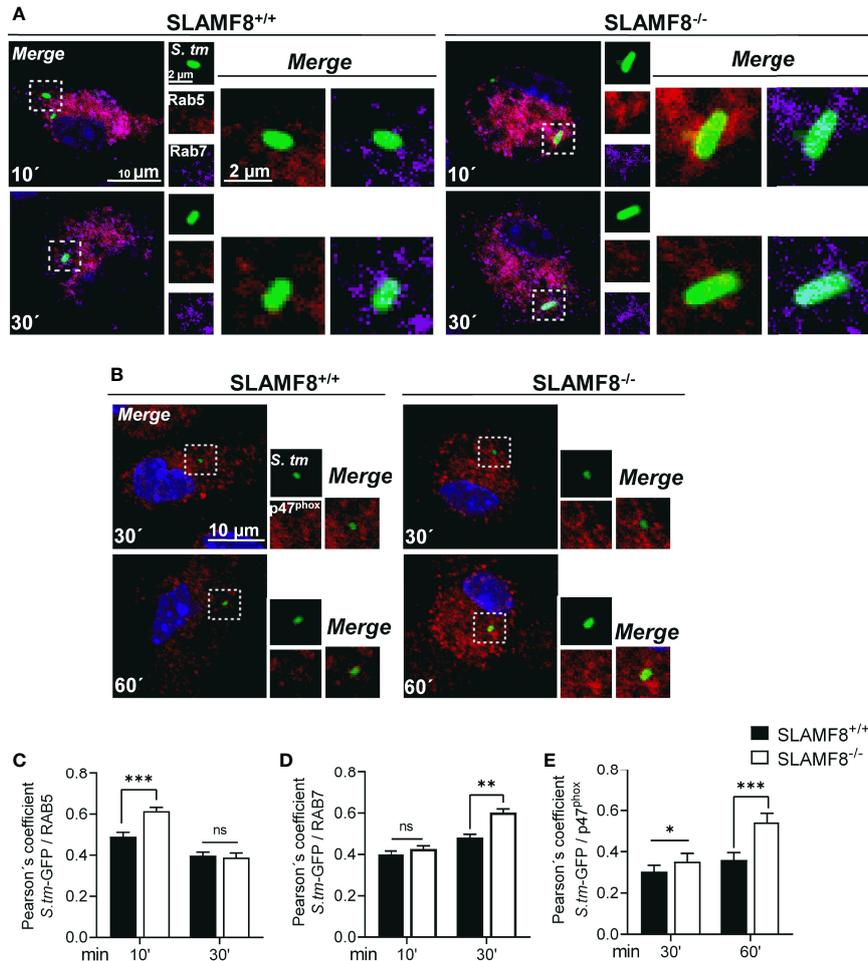


FIGURE 6 | SLAMF8^{-/-} pMφ show increased transport of Rab5, Rab7, and p47^{phox} to SCV compartment compared to SLAMF8^{+/+} pMφ. Analysis of pMφ infected with wild-type *S. typhimurium*-GFP (MOI 10) at different chase times and stained with antibodies against Rab5 (red), Rab7 (purple), and p47^{phox} (red). Nuclei were stained with DAPI. Representative confocal images of high-magnification views from z-stacks (merge) and maximum projection of each parameter (small square pictures) are shown. Scale bars are indicated. Colocalization of proteins with *S. typhimurium*-GFP was determined by the Pearson's correlation coefficient. Analyses were performed using the Nikon software. **(A)** Representative pictures of Rab5 (red) and Rab7 (purple) are shown **(C, D)**. Graphs show colocalization of Rab5 and Rab7 with *S. typhimurium*-GFP in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ. *Indicates statistical significance between samples (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **(B)** Representative pictures of p47^{phox} (red) and *S. typhimurium*-GFP in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ **(E)**. Colocalization of p47^{phox} (red) and *S. typhimurium*-GFP in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pMφ. *Indicates statistical significance for p47^{phox} between samples (*** $p < 0.001$). Values in the graph indicate the Pearson's coefficient \pm SEM ($n = 50$ stochastic cells per coverslip). Results of one out of three independent experiments are shown. ns, not Significant.

Overexpression of SLAMF8 Confirmed Its Negative Modulation of Mouse Macrophage Activation

Finally, to confirm the role of SLAMF8 in mouse macrophages, we analyzed whether overexpression of SLAMF8 showed the opposite phenotype. RAW264.7 Mφ transfected with cDNA encoding Myc-tagged *Slamf8* were infected with wild-type *S. typhimurium* (MOI 10), and analyses were performed at different follow-up times. Stable overexpression of *Slamf8* in RAW264.7 cells reversed SLAMF8^{-/-} associated phenotype. Hence, the relative expression levels of iNOS and IL-6 were lower in *Slamf8*-transfected RAW264.7 cells compared to mock-transfected cells when stimulated with *S. typhimurium* (Figures 9A, B). Overexpression of *Slamf8* also

showed statistically significantly lower phosphorylation of p40^{phox} on S and T154, and p47^{phox} on S, p38 MAPK, and ERK1/2 compared to mock-transfected RAW264.7 cells (Figures 9C, D). In accordance, the same results were observed in RAW264.7 cells stimulated with PMA and LPS (Figures S8, S9). These results corroborate SLAMF8-mediated negative modulation of NOX2 in mouse Mφ during *S. typhimurium* infection. Given all the *in vitro* results in the absence of SLAMF8, we analyzed *Salmonella* clearance *in vivo*.

SLAMF8^{-/-} Mice Exhibit Greater *S. typhimurium* Clearance *In Vivo*

Since SLAMF8^{-/-} Mφ showed increased iNOS, and NOX2 activity *in vitro*, we wondered whether SLAMF8^{-/-} mice develop an altered

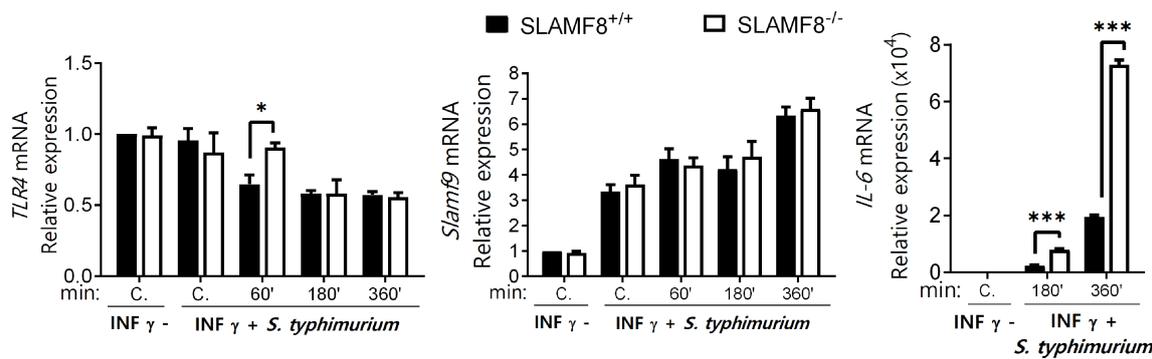


FIGURE 7 | SLAMF8^{-/-} pMφ show differences in IL-6 expression, but not in SLAMF9 or TLRs expression. Expression levels of the indicated mRNAs as determined by quantitative RT-PCR in pMφ treated with or without IFN γ (100 U/ml) for 16 h, and then infected with *wt S. typhimurium* (MOI 10) at different chase times. Expression of gene expression was normalized to basal expression levels of untreated cells (0/0). Data were analyzed by the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method and *HPRT1* was used as the reference gene. Results of two independent experiments are shown. **p* < 0.05; ****p* < 0.001. C, Control.

microbicidal response following *S. typhimurium* infection compared to *wt* mice. To analyze bacterial clearance, we used two strains of *Salmonella*: *wt S. typhimurium*, which could not be managed by mice (56), and the attenuated *S. typhimurium* SseB⁻ to evaluate microbicidal ability (31, 56). Wild-type and SLAMF8^{-/-} mice were injected intraperitoneally (i.p.) with the same amount of *Salmonella wt* and SseB⁻ bacteria [5×10^4 colony-forming units (CFUs)], and the number of CFUs was evaluated in tissue homogenates 48 h post infection. As expected, the bacterial burden of *wt Salmonella* and SseB⁻ isolated from spleen homogenates of SLAMF8^{-/-} mice was significantly lower than that in *wt* mice (Figure 10A). Moreover, the incremental number of *wt Salmonella* CFUs obtained from *wt* mice compared to that in SLAMF8^{-/-} mice indicated reduced replicative capability of *wt Salmonella* in SLAMF8-deficient mice (31, 49). Hence, SLAMF8^{-/-} mice exhibited significantly greater bactericidal activity and infection control than *wt* mice. Consistently, analysis of mice

infected with *S. typhimurium* also demonstrated significantly increased NOS induction in SLAMF8^{-/-} mice compared to *wt* mice, either in the peritoneal population or in spleen homogenates (Figures 10B, C).

DISCUSSION

In this study, we demonstrate the role of SLAMF8 in the negative modulation of Mφ activation *via* the PI3K pathway and its impact on the SCV progression and clearance of *Salmonella*. We believe that SLAMF8 downregulates the PI3K-PKC positive-feedback loop, since specific inhibition using LY294002 eliminated the differences observed between SLAMF8^{-/-} and *wt* pMφ, upon stimulating with either bacteria or PKC agonist. This agrees with the previous observation of increased polarization and migration of SLAMF8^{-/-} pMφ compared to *wt* pMφ (3),

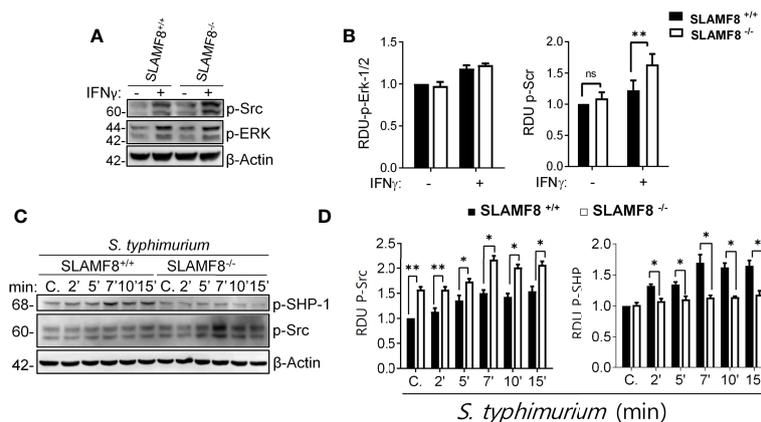


FIGURE 8 | SLAMF8 controls phosphorylation of Src and SHP-1 in pMφ upon *in vitro S. typhimurium* infection. (A, C) Representative Western blots (left) of the indicated proteins in pMφ, (A, B) treated with or without IFN γ (100 U/ml) for 16 h, and (C, D) treated with IFN γ with or without *wt S. typhimurium* (MOI 10) at different chase times. (B, D) Graphs represent the relative expression of the indicated proteins (right). Values indicate mean \pm SEM of three independent experiments **p* < 0.05, ***p* < 0.01. C, Control; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

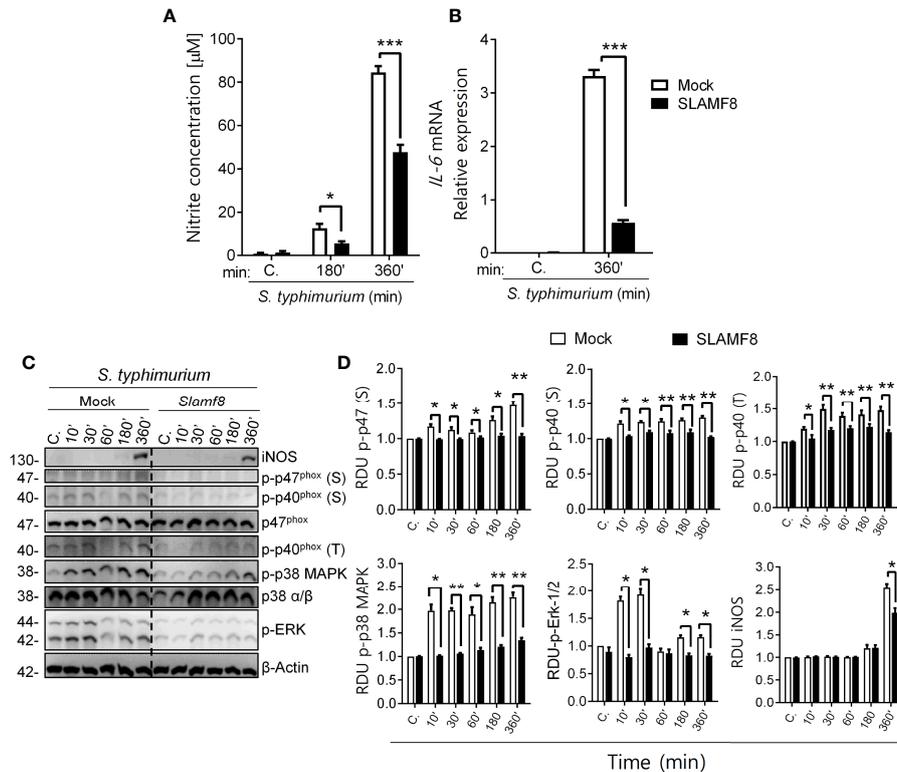
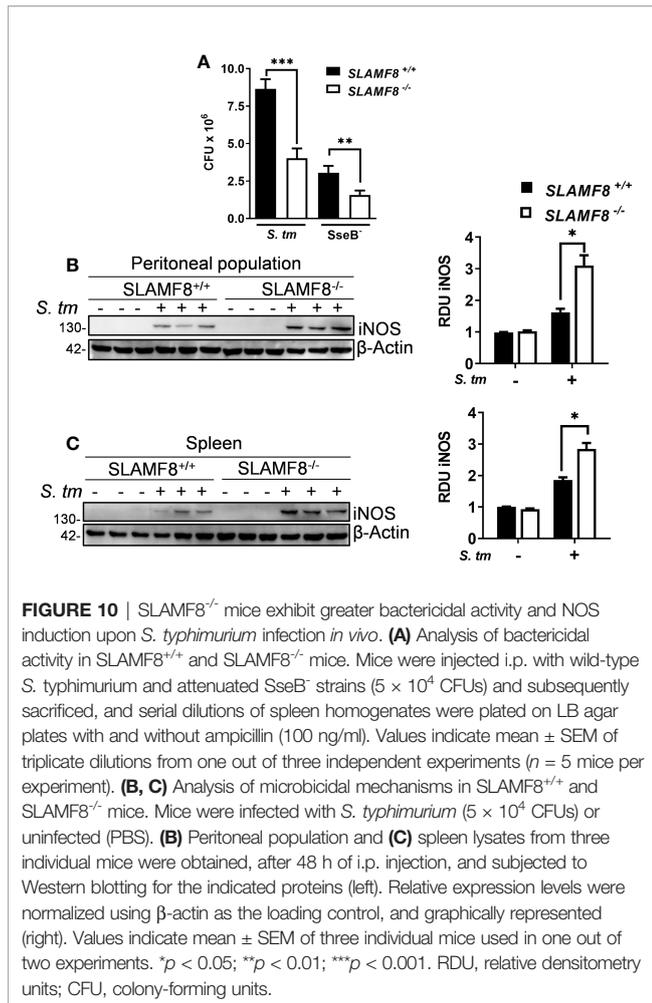


FIGURE 9 | Study of NOS type II induction, NOX2 activation through phosphorylation analysis of p47^{phox}, p40^{phox}, and p38/ERK MAPK in *SLAMF8* or mock-transfected RAW264.7 Mφ. Determination of NO production and *IL-6* mRNA expression. Stable clones isolated from RAW264.7 Mφ transfected with cDNA encoding Myc-tagged *Slamf8* or mock-transfected cells were infected with *S. typhimurium* (MOI 10) at different chase times. The protein samples were subjected to Western blot analysis and results of one out of three independent experiments are shown. **(A)** Analysis of nitrite production in *Slamf8* or mock-transfected RAW264.7 Mφ. Histogram shows nitrite concentration [μM], as determined by the Griess reaction, in Mφ infected with *S. typhimurium* at different chase times. Values indicate mean ± SEM. **(B)** Relative expression of *il-6* mRNA in Myc-tagged *Slamf8* or mock-transfected RAW264.7 cells infected with *S. typhimurium* (MOI10) as analyzed by quantitative RT-PCR. **(C)** Representative Western blots of indicated phosphorylated proteins and levels of iNOS/NOS type II are shown. **(D)** Relative expression of phosphorylated proteins as indicated in **(C)** Phosphorylation levels were normalized to appropriate loading control and are graphically represented. Gene expression was normalized to basal expression levels of mock-transfected RAW264.7 cells. Data were analyzed by the 2^{-ΔΔCt} method, and *HPRT1* was used as the reference gene. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. C, control; MOI, multiplicity of infection; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

which is regulated through the PI3K-PKC positive-feedback loop (57, 58). On the other hand, PI3K inhibition also reduced the differences in MAPK activation, which is also dependent on PI3K (22), while with the p38 MAPK inhibitor, SB203580, significant differences were still observed between the two types of cells. This result indicates a p38 MAPK positive feedback on NOX2 subunit activation. Furthermore, our results indicate that *SLAMF8* negatively modulates primary early signaling in Mφ, since priming *SLAMF8*^{-/-} Mφ with IFNγ or pure LPS showed increased Src and PI3K activation, respectively, compared to *wt* Mφ. The activation of Src kinase through IFNγ signaling has been documented in human and mouse Mφ (59–61), as well as the participation of Src kinase upon PI3K-dependent NOX2 activation in *Salmonella* or LPS-stimulated Mφ (53, 62). Additionally, increased ROS production enhanced the activation of Src kinases and reduced SHP-1 activity (63, 64) in the absence of *SLAMF8*, thereby promoting further increase in cell activation. In fact, inhibition of ROS with diphenyleneiodonium

was documented to reduce the enhanced migration of *SLAMF8*^{-/-} Mφ [4].

Regulation of NOX2 activation and phagosome–lysosome fusion are key mechanisms to ensure *Salmonella* survival and replication in infected Mφ (55, 65). In agreement with *SLAMF8*-mediated negative modulation of PI3K signal and phagosome NOX2 activity, we observed impairment of *Salmonella* inhibition during early SCV progression determined by increased p47^{phox} recruitment in *SLAMF8*^{-/-} pMφ (35, 47, 48), and resulted in increased NO production (66). All these are in consonance with the inferior phagosome acidification in *SLAMF8*^{-/-} Mφ (4), and thus reduced *Salmonella* replication and greater bacterial clearance in *SLAMF8*^{-/-} mice. In fact, acidic pH of the SCV favors *Salmonella* survival and replication (67). Therefore, the strategy of *Salmonella* to inhibit early SCV progression is impaired in *SLAMF8*-deficient Mφ (48). The mechanism underlying this phenomenon requires further analysis. Nonetheless, these results suggest that *SLAMF8* expression may also modulate phagosome–lysosome fusion



mechanisms in mouse M ϕ . Modulation of phagosome microbicidal mechanisms by SLAMF1 has also been documented (50), but in contrast to SLAMF8, SLAMF1-deficient pM ϕ showed delayed phagosome maturation and lower phagosomal pH (50). These data suggest that SLAMF8 may adjust the phagosome by downregulating SLAMF1 signaling. The molecular mechanism that mediates SLAMF8 inhibition is unraveled. Since SLAMF8 is itself ligand and has no known cytoplasmic motifs, it is unlikely that it operates signal inhibition through any adaptor protein. One possibility would be that SLAMF8 functions in competitive inhibition with SLAMF1 (2). In this sense, SLAMF8 interaction with itself in the same cell (*cis* interaction) may reduce SLAMF1 interaction with either neighboring cells or the pathogen (*trans* interaction), as described for SLAMF2 in NK cells (68).

Recently, Zeng et al. (51) proposed the combined role of SLAMF8 and SLAMF9 in response to LPS-mediated sepsis, downregulating TLR4 in M ϕ . As mentioned, pure LPS treatment increased the priming of NOX2 in SLAMF8^{-/-} pM ϕ compared to wt pM ϕ (69, 70). The authors did not observe any phenotype in single knock out RAW264.7 M ϕ for SLAMF8 or SLAMF9. In contrast, we did not observe differences in TLR expression in *Salmonella*-infected SLAMF8-deficient pM ϕ compared to wt (Figure S6), but we described increased IL-6 expression compared to wt pM ϕ , which

might also enhance M ϕ activation. Although our study analyzed the *Salmonella* sepsis model, which is a cytoplasmic germ, and used different techniques, we believe that SLAMF9, in addition to SLAMF1, may function to increase M ϕ activation in the absence of SLAMF8. Noticeably, other authors have shown a detrimental effect in plasmocytic dendritic cell functionality and in *Salmonella*-infected mice dependent on single SLAMF9 deficiency (71, 72). On the other hand, we should not exclude the possibility, as shown for other SLAMF members, that SLAMF8 can operate as a PAMP-R. The modulation of M ϕ activation by SLAMF receptors in association with TLRs has also been described (2). For instance, SLAMF1 mediates TLR4 signaling by forming a complex with PI3K-Vps34, both in humans and in mouse M ϕ (73, 74).

In conclusion, early intervention of SLAMF8 upon bacterial encounter modulates early IFN γ and PAMP-R signaling dependent on PI3K pathway, reducing microbicidal activation of mouse M ϕ . All these data suggest that SLAMF8 could be a target for therapeutic intervention in the control of chronic or inflammatory immune responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation, University of Granada (References: CEEA-379 y CEEA-417-2012). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SR-P, DR-B, LM-d-L, and ACA-M performed research and the statistical analysis of the results. D-RB and MR-M were involved in data collection and analysis and assisted in performing the experiments. EM-G assisted in performing RAB5 and RAB7 experiments. FA-M and CT contributed to the assembly and assisted in performing the experiments. ACA-M designed the different experiments, interpreted the results, contributed to the financial support, and wrote the manuscript. SR-P and MR-M helped to edit and reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research project was supported by the *Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación*, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la

Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (Grants PII6/01642 and PII0/01096).

Granada, for their excellent technical assistance with confocal microscopy, and Dr. M.C. Ruiz-Ruiz and Dr. Silvia Calpe-Flores for revising the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

SR-P is a PhD student belonging to the Official Doctoral Program in Biomedicine of the University of Granada. The authors thank Dr. Ana Santos Carro and Dr. David Porcell from the Center of Technical Instrumentation, University of

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.910112/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Calpe S, Wang N, Romero X, Berger SB, Lanyi A, Engel P, et al. The SLAM and SAP Gene Families Control Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv Immunol* (2008) 97:177–250. doi: 10.1016/S0065-2776(08)00004-7
- van Driel BJ, Liao G, Engel P, Terhorst C. Responses to Microbial Challenges by SLAMF Receptors. *Front Immunol* (2016) 0:4. doi: 10.3389/FIMMU.2016.00004
- Wang G, van Driel BJ, Liao G, O’Keeffe MS, Halibozek PJ, Flipse J, et al. Migration of Myeloid Cells During Inflammation Is Differentially Regulated by the Cell Surface Receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One* (2015) 10(3):1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0121968
- Wang G, Abadía-Molina AC, Berger SB, Romero X, O’Keeffe MS, Rojas-Barros DI, et al. Cutting Edge: Slamf8 Is a Negative Regulator of Nox2 Activity in Macrophages. *J Immunol* (2012) 188:5829–5832. doi: 10.4049/jimmunol.1102620
- Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM-C, El-Benna J. NADPH Oxidase Activation in Neutrophils: Role of the Phosphorylation of its Subunits. *Eur J Clin Invest* (2018) 48:e12951. doi: 10.1111/EJC.12951
- Groemping Y, Rittinger K. Activation and Assembly of the NADPH Oxidase: A Structural Perspective. *Biochem J* (2005) 386:401–16. doi: 10.1042/BJ20041835
- Vignais PV. The Superoxide-Generating NADPH Oxidase: Structural Aspects and Activation Mechanism. *Cell Mol Life Sci* (2002) 59:1428–59. doi: 10.1007/S00018-002-8520-9
- Kim C, Dinauer MC. Rac2 Is an Essential Regulator of Neutrophil Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Activation in Response to Specific Signaling Pathways. *J Immunol* (2001) 166:1223–32. doi: 10.4049/JIMMUNOL.166.2.1223
- Fontayne A, My-Chan Dang P, Gougerot-Pocidallo M-A, Benna J. Phosphorylation of P47phox Sites by PKC α , β , δ , and ζ : Effect on Binding to P22phox and on NADPH Oxidase Activation. *Biochemistry* (2002) 41:7743–50. doi: 10.1021/BI011953S
- El-Benna J, Dang PM-C, 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) 30:279–89. doi: 10.1007/S00281-008-0118-3
- Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. P40phox 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) 273:30097–103. doi: 10.1074/JBC.273.46.30097
- Someya A, Nunoi H, Hasebe T, Nagaoka I. Phosphorylation of P40-Phox During Activation of Neutrophil NADPH Oxidase. *J Leukoc Biol* (1999) 66:851–7. doi: 10.1002/JLB.66.5.851
- el Benna J, Faust LRP, Johnson JL, Babior BM. 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) 271:6374–8. doi: 10.1074/JBC.271.11.6374
- el Benna J, Jiahuai H, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. 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. doi: 10.1006/ABBI.1996.0470
- Ago T, Nunoi H, Ito T, 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(47):33644–53. doi: 10.1074/jbc.274.47.33644
- Dang PM-C, Fontayne A, Hakim J, el Benna J, Périain A. Protein Kinase C ζ Phosphorylates a Subset of Selective Sites of the NADPH Oxidase Component P47phox and Participates in Formyl Peptide-Mediated Neutrophil Respiratory Burst. *J Immunol* (2001) 166:1206–13. doi: 10.4049/JIMMUNOL.166.2.1206
- Inanami O, Johnson JL, McAdara JK, el Benna J, Faust LRP, Newburger PE, et al. Activation of the Leukocyte NADPH Oxidase by Phorbol Ester Requires the Phosphorylation of P47phox on Serine 303 or 304. *J Biol Chem* (1998) 273:9539–43. doi: 10.1074/JBC.273.16.9539
- Dang PM-C, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, et al. A Specific P47phox -Serine Phosphorylated by Convergent MAPKs Mediates Neutrophil NADPH Oxidase Priming at Inflammatory Sites. *J Clin Invest* (2006) 116:2033–43. doi: 10.1172/JCI27544
- Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo M-A, 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) 165:5238–44. doi: 10.4049/JIMMUNOL.165.9.5238
- Hawkins PT, Davidson K, Stephens LR. The Role of PI3Ks in the Regulation of the Neutrophil NADPH Oxidase. *Biochem Soc Symp* (2007) 74:59–67. doi: 10.1042/BSS2007C06/51032/THE-ROLE-OF-PI3KS-IN-THE-REGULATION-OF-THE
- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, et al. Akt Phosphorylates P47 Phox and Mediates Respiratory Burst Activity in Human Neutrophils. *J Immunol* (2003) 170:5302–8. doi: 10.4049/JIMMUNOL.170.10.5302
- Pacquelet S, Johnson JL, Ellis BA, Brzezinska AA, Lane WS, Munafo DB, et al. Cross-Talk Between IRAK-4 and the NADPH Oxidase. *Biochem J* (2007) 403:451–61. doi: 10.1042/BJ20061184
- Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Cui Y-D, 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) 467:253–8. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01167-4
- Kao YY, Gianni D, Bohl B, Taylor RM, Bokoch GM. Identification of a Conserved Rac-Binding Site on NADPH Oxidases Supports a Direct GTPase Regulatory Mechanism. *J Biol Chem* (2008) 283:12736–46. doi: 10.1074/JBC.M801010200
- Yamamori T, Inanami O, Sumimoto H, Akasaki T, Nagahata H, 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) 293:1571–8. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00418-7
26. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Garry Adams L, Bäumlner AJ. Animal Models of Salmonella Infections: Enteritis Versus Typhoid Fever. *Microbes Infect* (2001) 3:1335–44. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01495-2
 27. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages *In Vitro*. *J Exp Med* (2000) 192:227–36. doi: 10.1084/JEM.192.2.227
 28. Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. Salmonella Pathogenicity Island 2 Mediates Protection of Intracellular Salmonella From Reactive Nitrogen Intermediates. *J Exp Med* (2002) 195:1155–66. doi: 10.1084/JEM.20011547
 29. Mattoo S, Lee YM, Dixon JE. Interactions of Bacterial Effector Proteins With Host Proteins. *Curr Opin Immunol* (2007) 19:392–401. doi: 10.1016/J.COI.2007.06.005
 30. Eswarappa SM, Janice J, Nagarajan AG, Balasundaram Sv, Karnam G, Dixit NM, et al. Differentially Evolved Genes of Salmonella Pathogenicity Islands: Insights Into the Mechanism of Host Specificity in Salmonella. *PLoS One* (2008) 3:e3829. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003829
 31. Hölzer SU, Hensel M. Divergent Roles of Salmonella Pathogenicity Island 2 and Metabolic Traits During Interaction of *S. Enterica* Serovar Typhimurium With Host Cells. *PLoS One* (2012) 7:e33220. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0033220
 32. Laroux FS, Romero X, Wetzler L, Engel P, Terhorst C. Cutting Edge: MyD88 Controls Phagocyte NADPH Oxidase Function and Killing of Gram-Negative Bacteria. *J Immunol* (2005) 175:5596–600. doi: 10.4049/JIMMUNOL.175.9.5596
 33. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, et al. Neutrophils Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide Upregulate NADPH Oxidase Assembly. *J Clin Invest* (1998) 101:455–63. doi: 10.1172/JCI949
 34. Hua K-F, Wang S-H, Dong W-C, Lin C-Y, Ho C-L, Wu T-H. High Glucose Increases Nitric Oxide Generation in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages by Enhancing Activity of Protein Kinase C- α / δ and NF- κ B. *Inflammation Res* (2012) 61:1107–16. doi: 10.1007/S00011-012-0503-1
 35. Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R, 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) 419:329–38. doi: 10.1042/BJ20082028
 36. Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER, et al. Investigation of Neutrophil Signal Transduction Using a Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J Immunol* (1995) 154(5):2413–22.
 37. Chessa TAM, Anderson KE, Hu Y, Xu Q, Rausch O, Stephens LR, et al. Phosphorylation of Threonine 154 in P40phox Is an Important Physiological Signal for Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase. *Blood* (2010) 116:6027–36. doi: 10.1182/BLOOD-2010-08-300889
 38. Komander D, Kular GS, Schüttelkopf AW, Deak M, Prakash KRC, Bain J, et al. Interactions of LY333531 and Other Bisindolyl Maleimide Inhibitors With PDK1. *Structure* (2004) 12:215–26. doi: 10.1016/J.STR.2004.01.005
 39. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and Mechanism of Action of Some Commonly Used Protein Kinase Inhibitors. *Biochem J* (2000) 351:95. doi: 10.1042/0264-6021:3510095
 40. Casanova JL. IL-12 and IFN- γ in Host Defense Against Mycobacteria and Salmonella in Mice and Men. *Curr Opin Immunol* (1999) 11:346–51. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80055-7
 41. Steele-Mortimer O. The Salmonella-Containing Vacuole—Moving With the Times. *Curr Opin Microbiol* (2008) 11:38–45. doi: 10.1016/J.MIB.2008.01.002
 42. Méresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP. The Rab7 GTPase Controls the Maturation of Salmonella Typhimurium-Containing Vacuoles in HeLa Cells. *EMBO J* (1999) 18:4394–403. doi: 10.1093/EMBOJ/18.16.4394
 43. Lathrop SK, Cooper KG, Binder KA, Starr T, Mampilli V, Detweiler CS, et al. Salmonella Typhimurium Infection of Human Monocyte-Derived Macrophages. *Curr Protoc Microbiol* (2018) 50:e56. doi: 10.1002/CPMC.56
 44. Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, et al. Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. II. Effects on Microbial Proliferation and Host Survival *In Vivo*. *J Exp Med* (2000) 192:237–48. doi: 10.1084/JEM.192.2.237
 45. Yadav S, Pathak S, Sarikhani M, Majumdar S, Ray S, Chandrasekar BS, et al. Nitric Oxide Synthase 2 Enhances the Survival of Mice During Salmonella Typhimurium Infection-Induced Sepsis by Increasing Reactive Oxygen Species, Inflammatory Cytokines and Recruitment of Neutrophils to the Peritoneal Cavity. *Free Radical Biol Med* (2018) 116:73–87. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.12.032
 46. Steele-Mortimer O, Méresse S, Gorvel J-P, Toh B-H, Finlay BB. Biogenesis of Salmonella Typhimurium-Containing Vacuoles in Epithelial Cells Involves Interactions With the Early Endocytic Pathway. *Cell Microbiol* (1999) 1:33–49. doi: 10.1046/J.1462-5822.1999.00003.X
 47. Smith AC, do HW, Braun V, Jiang X, Macrae C, Casanova JE, et al. A Network of Rab GTPases Controls Phagosome Maturation and Is Modulated by Salmonella Enterica Serovar Typhimurium. *J Cell Biol* (2007) 176:263–8. doi: 10.1083/JCB.200611056
 48. Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O. The Mechanism of Salmonella Entry Determines the Vacuolar Environment and Intracellular Gene Expression. *Traffic* (2006) 7:39–51. doi: 10.1111/J.1600-0854.2005.00360.X
 49. Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V. Salmonella SPI1 Effector SipA Persists After Entry and Cooperates With a SPI2 Effector to Regulate Phagosome Maturation and Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* (2007) 1:63–75. doi: 10.1016/J.CHOM.2007.02.001
 50. Berger SB, Romero X, Ma C, Wang G, Faubion WA, Liao G, et al. SLAM Is a Microbial Sensor That Regulates Bacterial Phagosome Functions in Macrophages. *Nat Immunol* (2010) 11:920–7. doi: 10.1038/ni.1931
 51. Zeng X, Liu G, Peng W, He J, Cai C, Xiong W, et al. Combined Deficiency of SLAMF8 and SLAMF9 Prevents Endotoxin-Induced Liver Inflammation by Downregulating TLR4 Expression on Macrophages. *Cell Mol Immunol* (2020) 17:153–162. doi: 10.1038/s41423-018-0191-z
 52. Byeon SE, Yi YS, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY. The Role of Src Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm* (2012) 2012:1–18. doi: 10.1155/2012/512926
 53. Wiedemann A, Rosselin M, Mijouin L, Botteau E, Velge P. Involvement of C-Src Tyrosine Kinase Upstream of Class I Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinases in Salmonella Enteritidis Rck Protein-Mediated Invasion. *J Biol Chem* (2012) 287:31148–54. doi: 10.1074/JBC.M112.392134
 54. Krötz F, Engelbrecht B, Buerkle MA, Bassermann F, Bridell H, Gloe T, et al. The Tyrosine Phosphatase, SHP-1, Is a Negative Regulator of Endothelial Superoxide Formation. *J Am Coll Cardiol* (2005) 45:1700–6. doi: 10.1016/J.JACC.2005.02.039
 55. Chong ZZ, Maiese K. The Src Homology 2 Domain Tyrosine Phosphatases SHP-1 and SHP-2: Diversified Control of Cell Growth, Inflammation, and Injury. *Histol Histopathol* (2007) 22:1251–67. doi: 10.14670/HH-22.1251
 56. Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ. Differential Bacterial Survival, Replication, and Apoptosis-Inducing Ability of Salmonella Serovars Within Human and Murine Macrophages. *Infect Immun* (2000) 68:1005–13. doi: 10.1128/IAI.68.3.1005-1013.2000
 57. Evans JH, Falke JJ. Ca²⁺ Influx Is an Essential Component of the Positive-Feedback Loop That Maintains Leading-Edge Structure and Activity in Macrophages. *Proc Natl Acad Sci* (2007) 104:16176–81. doi: 10.1073/PNAS.0707719104
 58. Ziemba BP, Swisher GH, Masson G, Burke JE, Williams RL, Falke JJ. Regulation of a Coupled MARCKS-PI3K Lipid Kinase Circuit by Calmodulin: Single-Molecule Analysis of a Membrane-Bound Signaling Module. *Biochemistry* (2016) 55:6395. doi: 10.1021/ACS.BIOCHEM.6B00908
 59. Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. IFN- γ Receptor Signaling Mediates Spinal Microglia Activation Driving Neuropathic Pain. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106:8032–7. doi: 10.1073/PNAS.0810420106
 60. Chang Y-J, Holtzman MJ, Chen C-C. Differential Role of Janus Family Kinases (JAKs) in Interferon- γ -Induced Lung Epithelial ICAM-1 Expression: Involving Protein Interactions Between JAKs, Phospholipase C γ , C-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol* (2004) 65:589–98. doi: 10.1124/MOL.65.3.589
 61. Smyth D, Phan V, Wang A, McKay DM. Interferon- γ -Induced Increases in Intestinal Epithelial Macromolecular Permeability Requires the Src Kinase Fyn. *Lab Invest* (2011) 91:764–77. doi: 10.1038/labinvest.2010.208

62. Check J, Byrd CL, Menio J, Rippe RA, Hines IN, Wheeler MD. Src Kinase Participates in LPS-Induced Activation of NADPH Oxidase. *Mol Immunol* (2010) 47:756–62. doi: 10.1016/J.MOLIMM.2009.10.012
63. Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible Oxidation and Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases *In Vivo*. *Mol Cell* (2002) 9:387–99. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00445-8
64. Forman HJ, Torres M. Signaling by the Respiratory Burst in Macrophages. *IUBMB Life* (2001) 51:365–71. doi: 10.1080/152165401753366122
65. Kumawat M, Pesingi PK, Agarwal RK, Goswami TK, Mahawar M. Contribution of Protein Isoaspartate Methyl Transferase (PIMT) in the Survival of Salmonella Typhimurium Under Oxidative Stress and Virulence. *Int J Med Microbiol* (2016) 306:222–30. doi: 10.1016/J.IJMM.2016.04.005
66. Eriksson S, Chambers BJ, Rhen M. Nitric Oxide Produced by Murine Dendritic Cells Is Cytotoxic for Intracellular Salmonella Enterica Sv. Typhimurium. *Scand J Immunol* (2003) 58:493–502. doi: 10.1046/J.1365-3083.2003.01330.X
67. Allam US, Krishna MG, Sen M, Thomas R, Lahiri A, Gnanadhas DP, et al. Acidic pH Induced STM1485 Gene Is Essential for Intracellular Replication of Salmonella. *Virulence* (2012) 3:122–35. doi: 10.4161/VIRU.19029
68. Claus M, Urlaub D, Fasbender F, Watzl C. SLAM Family Receptors in Natural Killer Cells – Mediators of Adhesion, Activation and Inhibition *via* Cis and Trans Interactions. *Clin Immunol* (2019) 204:37–42. doi: 10.1016/J.CLIM.2018.10.011
69. Vogt KL, Summers C, Chilvers ER, Condliffe AM. Priming and De-Priming of Neutrophil Responses *In Vitro* and *In Vivo*. *Eur J Clin Invest* (2018) 48: e12967. doi: 10.1111/ECI.12967
70. Dewas C, Dang PM-C, Gougerot-Pocidal M-A, El-Benna J. TNF- α Induces Phosphorylation of P47phox in Human Neutrophils: Partial Phosphorylation of P47phox Is a Common Event of Priming of Human Neutrophils by TNF- α and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Immunol* (2003) 171:4392–8. doi: 10.4049/JIMMUNOL.171.8.4392
71. Sever L, Radomir L, Stirn K, Wiener A, Schottlender N, Lewinsky H, et al. SLAMF9 Regulates pDC Homeostasis and Function in Health and Disease. *Proc Natl Acad Sci* (2019) 116:16489–96. doi: 10.1073/PNAS.1900079116
72. Wilson TJ, Clare S, Mikulin J, Johnson CM, Harcourt K, Lyons PA, et al. Signalling Lymphocyte Activation Molecule Family Member 9 Is Found on Select Subsets of Antigen-Presenting Cells and Promotes Resistance to Salmonella Infection. *Immunology* (2020) 159:393–403. doi: 10.1111/IMM.13169
73. Yurchenko M, Skjesol A, Ryan L, Richard GM, Kandasamy RK, Wang N, et al. SLAMF1 Is Required for TLR4-Mediated TRAM-TRIF-dependent Signaling in Human Macrophages. *J Cell Biol* (2018) 217:1411–29. doi: 10.1083/JCB.201707027
74. Ma C, Wang N, Detre C, Wang G, O’Keeffe M, Terhorst C. Receptor Signaling Lymphocyte-Activation Molecule Family 1 (Slamf1) Regulates Membrane Fusion and NADPH Oxidase 2 (NOX2) Activity by Recruiting a Beclin-1/Vps34/Ultraviolet Radiation Resistance-Associated Gene (UVRAG) Complex. *J Biol Chem* (2012) 287:18359–65. doi: 10.1074/JB

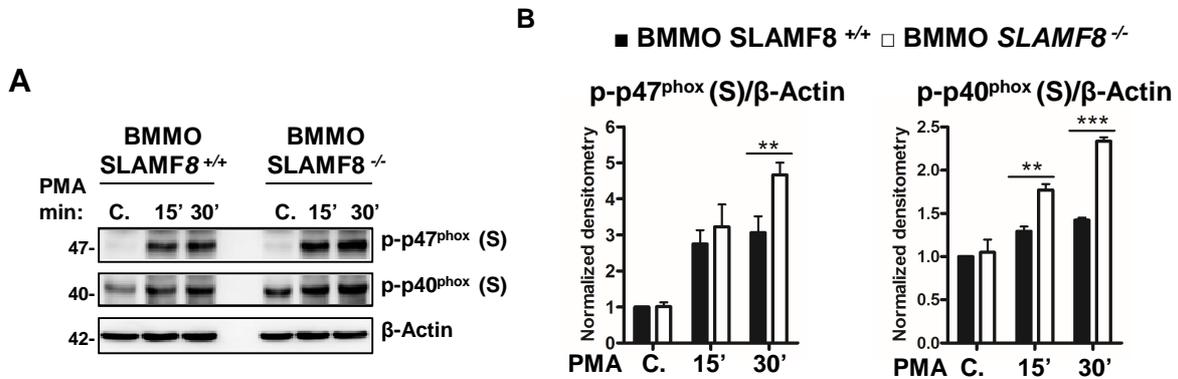
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Romero-Pinedo, Barros, Ruiz-Magaña, Maganto-García, Moreno de Lara, Abadía-Molina, Terhorst and Abadía-Molina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SUPPLEMENTARY FIGURE

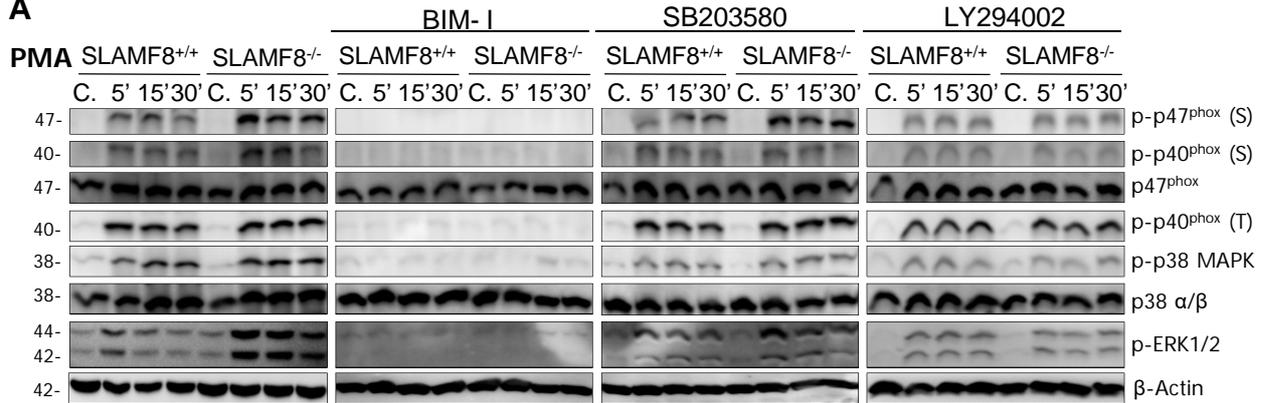
Figure S1



S1 Figure. Bone marrow-derived macrophages of SLAMF8^{-/-} mice show increased NOX2-subunit activation upon PMA agonist stimulation. Analysis of phosphorylated p47^{phox} and p40^{phox} in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} bone marrow derived Mø stimulated with PMA [100 ng/ml] at different time points. **(A)** Representative western blots of analyzed proteins in Mø stimulated with PMA. Results of one out of three independent experiments is shown. **(B)** Relative expressions levels of phosphorylated proteins as indicated in A. Relative phosphorylation levels were normalized to appropriate loading control and are graphically represented. Values indicate mean ± SEM of three independent experiments. **p*<0.05; ***p*<0.01. C., control; R, resting cells; S, serine; T, threonine; RDU, relative densitometry units. BMMO: bone marrow derived macrophages. S, Serine; T, Threonine.

Figure S2.

A



B

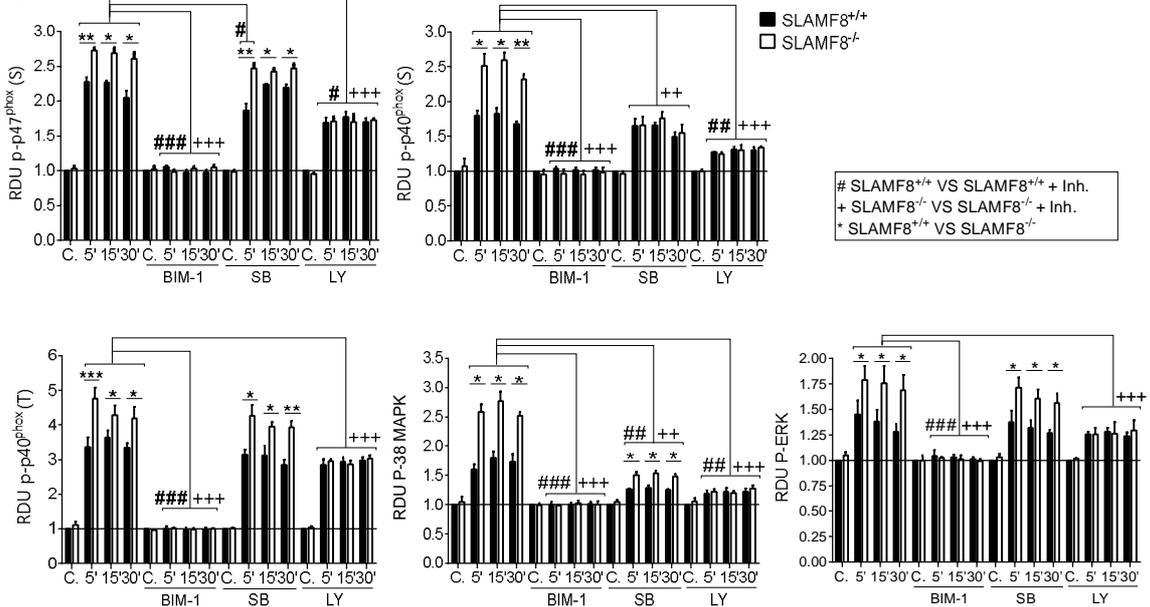


Figure S2. Study of NOX2 activation through phosphorylation analysis of p47^{phox}, p40^{phox}, p38/ERK MAPK in SLAMF8^{-/-} pretreated with inhibitors and stimulated with PMA. pMø were pretreated with or without 5 μM bisindolylmaleimide I (BIM-1), 10 μM SB203580 (SB), or 10 μM LY294002 (Ly) for 1 h, and stimulated with 100 ng/ml of PMA at different time points. **(A)** Representative western blots of the indicated proteins in pMø pretreated with or without the indicated inhibitors and stimulated PMA. Results of one out of three independent experiments are shown. **(B)** Relative expression levels of phosphorylated proteins as indicated in A. Levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} pMø vs SLAMF8^{-/-} pMø at each time point, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # indicates differences between SLAMF8^{+/+} pMø vs SLAMF8^{+/+} pMø treated with inhibitors. # $p < 0.05$; ## $p < 0.1$; ### $p < 0.001$; + indicates differences between SLAMF8^{-/-} pMø vs SLAMF8^{-/-} pMø treated with inhibitors, + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$. Values indicate mean \pm S.E.M. of three independent experiments. C., Control; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, threonine.

Figure S3.

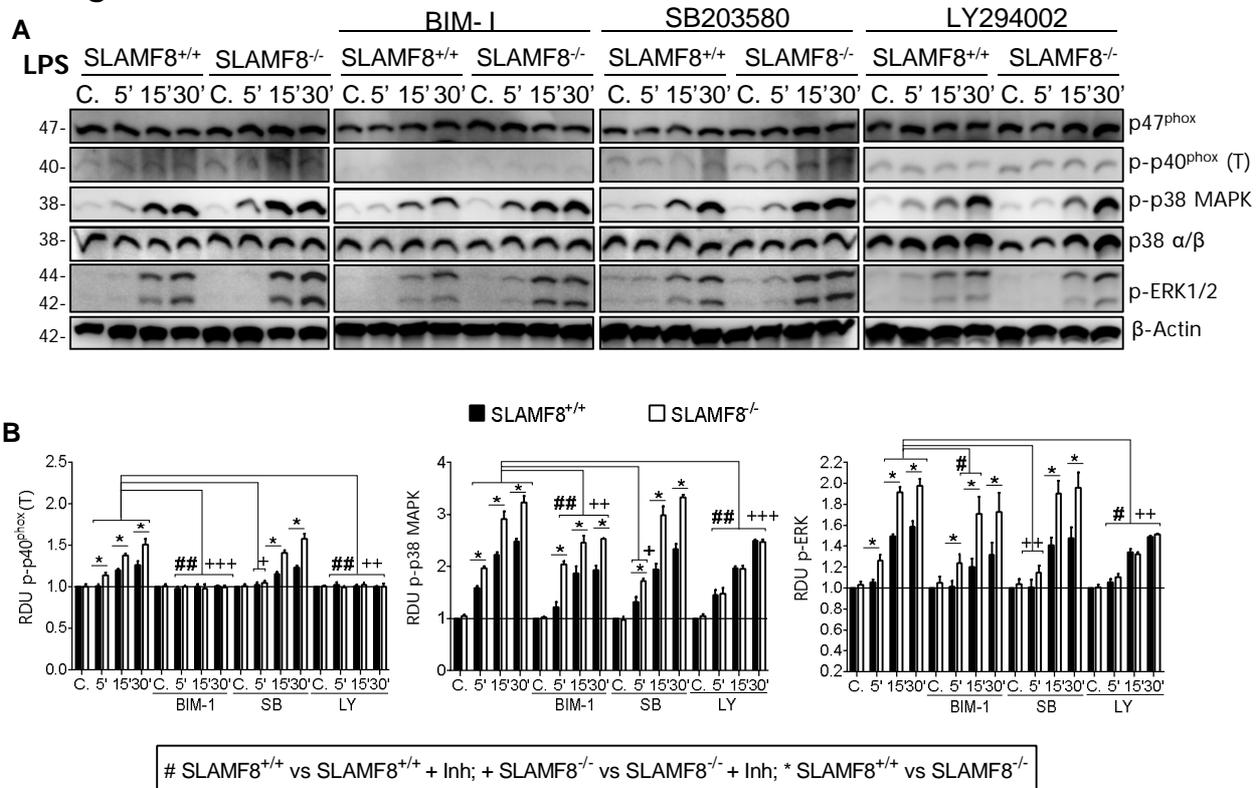


Figure S3. Study of NOX2 activation through phosphorylation analysis of p47^{phox}, p40^{phox}, p38/ERK MAPK in SLAMF8^{-/-} macrophages pretreated with inhibitors and stimulated with LPS. pM ϕ were pretreated with or without 5 μ M bisindolylmaleimide I (BIM-1), 10 μ M SB203580 (SB), or 10 μ M LY294002 (Ly) for 1 h, and stimulated with 100 ng/ml of PMA (A) or 10 μ g/ml pure LPS at different time points. **(A)** Representative western blots of the indicated proteins in pM ϕ pretreated with or without the indicated inhibitors and stimulated LPS. **(B)** Relative expression levels of phosphorylated proteins as indicated in A. Levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} pM ϕ vs SLAMF8^{-/-} pM ϕ at each time point, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # indicates differences between SLAMF8^{+/+} pM ϕ vs SLAMF8^{+/+} pM ϕ treated with inhibitors. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; + indicates differences between SLAMF8^{-/-} pM ϕ vs SLAMF8^{-/-} pM ϕ treated with inhibitors, + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$. Values indicate mean \pm S.E.M. of three independent experiments. C., Control; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, threonine.

Figure S4.

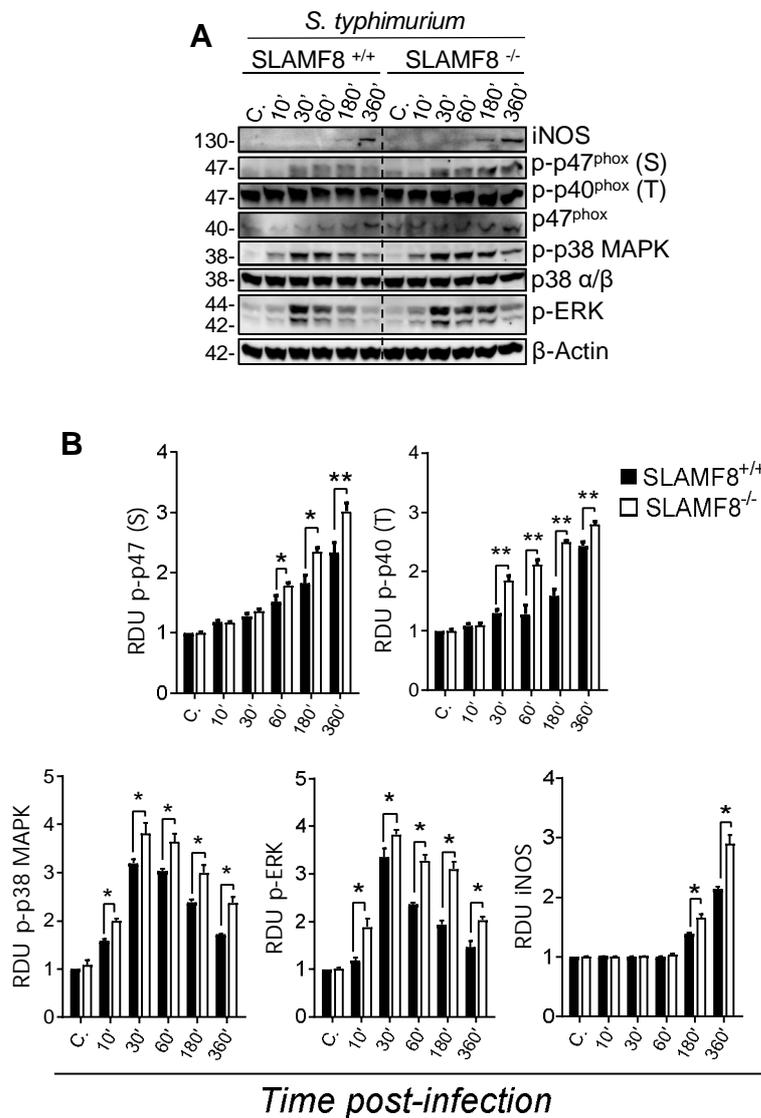


Figure S4. Analyses of activation of NOX2 subunits, ERK1/2 and p38 MAPK in SLAMF8^{+/+} and SLAMF8^{-/-} pM ϕ upon infection *in vitro* with *S. typhimurium*. pM ϕ were infected with *S. typhimurium* (MOI 10) and analyzed at different time post-infection. **(A)** Representative western blots of indicated protein lysates. Results of one out of three independent experiments is shown. **(B)** Relative expression of phosphorylated proteins indicated in A, levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. Values indicate mean \pm SEM. *Indicates differences between SLAMF8^{+/+} vs SLAMF8^{-/-} cells at each time point, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

Figure S5

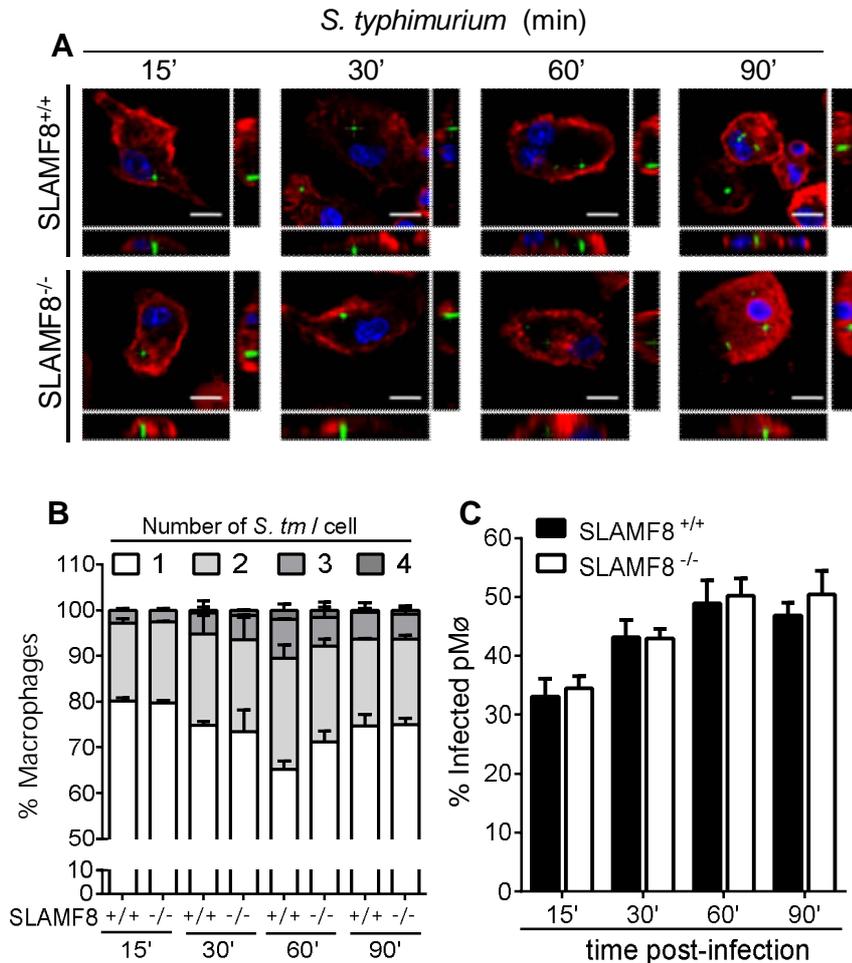


Figure S5. Analysis of phagocytosis in pMø infected with *S. typhimurium*-GFP by confocal images. pMø were infected with *S. typhimurium*-GFP and stained with phalloidin-TRITC (indicates plasma membrane surrounding) to visualize phagocytic bacteria. Cell nuclei were stained with DAPI. Confocal images (z-projection) and orthogonal views were used to analyze the bacterial uptake, Scale bar: 10 μm (60X). **(D)** Percentage of pMø infected and the number of *S. typhimurium* per cell is indicated. **(E)** Percentage of pMø infected with *S. typhimurium*. Mean ± SEM of three independent experiments is shown (n=100 stochastic cells analyzed per coverslip and experiment). %, percentage; RDU, relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

Figure S6.

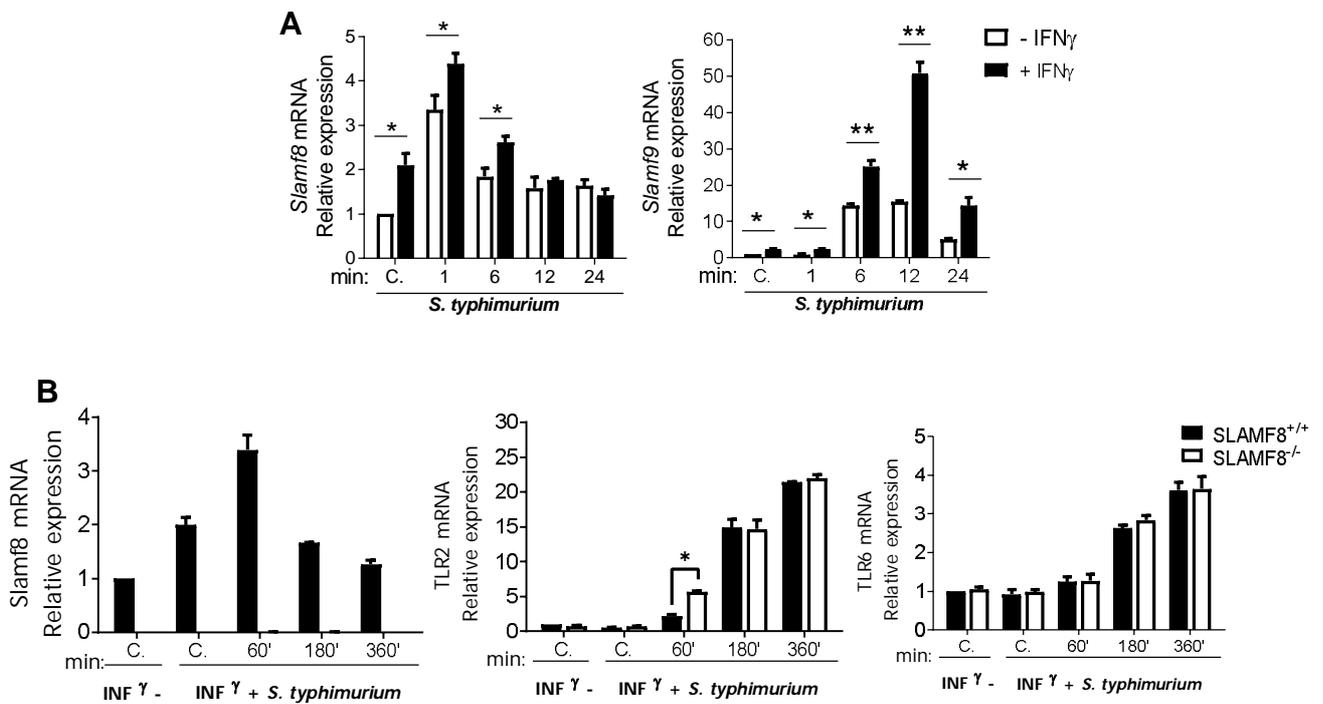


Figure S6. SLAMF8^{-/-} pMø do not show differences in SLAMF9 or TLRs expression. Expression levels of the indicated mRNAs as determined by quantitative RT-PCR in pMø treated with or without IFN γ (100 U/ml) for 16 h, and then infected with *wt S. typhimurium* (MOI 10) at different chase times. **(A)** Expression of *Slamf8* and *Slamf9* in *wt* pMø. **(B)** Expression of the indicated genes in *wt* and SLAMF8^{-/-} pMø. Gene expression was normalized to basal expression levels of untreated cells (C.). Data were analyzed by the 2^{- $\Delta\Delta$ ct} method and *HPRT1* was used as the reference gene. Results of two independent experiments are shown. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.

Figure S7.

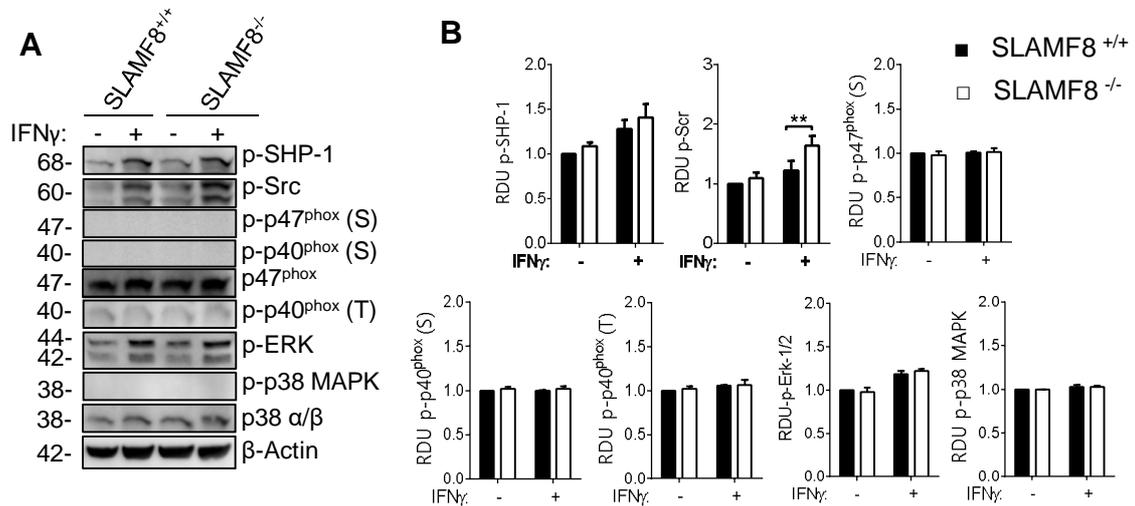


Figure S7. Study of Proteins activation in pM ϕ stimulated with IFN γ . Increased phosphorylation of Src. (A) Representative western blots (left) of the indicated proteins in pM ϕ treated with or without IFN γ (100 U/ml) for 16 h. **(B)** Graphs represent the relative expression of the indicated proteins (right). Levels were normalized to appropriate loading controls and are graphically represented. Values indicate mean \pm SEM of three independent experiments * p <0.05, ** p <0.01. RDU, Relative densitometry units; S, Serine; T, Threonine.

Figure S8.

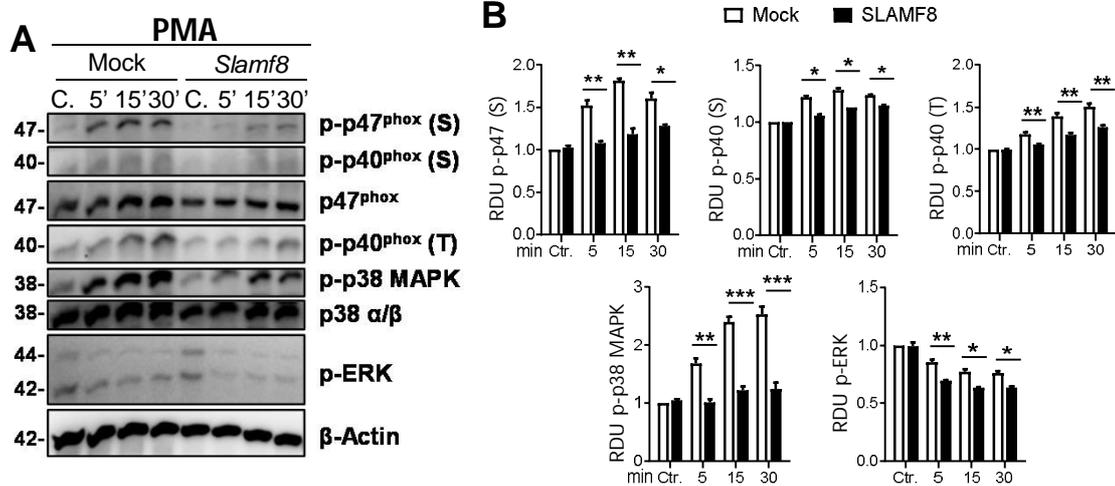


Figure S8. Study of NOX2 activation through phosphorylation analysis of p47^{phox}, p40^{phox} and p38/ERK MAPK in *Slamf8* or mock-transfected RAW264.7 Mφ. Stimulations with PMA. Stable clones isolated from RAW264.7 Mφ transfected with cDNA encoding Myc-tagged *Slamf8* (■) or mock transfected (□) were activated with 100 ng/ml PMA at different times. **(A)** Representative western blots of indicated proteins are shown. Results of one out of three independent experiments is shown. **(B)** Relative expression levels of the indicated proteins in A. Relative phosphorylation levels were normalized to appropriate loading control and are graphically represented. Values indicate mean ± SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Ctr., control; RDU, relative densitometry units; Ser/S, Serine; Thr/T, Threonine.

Figure S9.

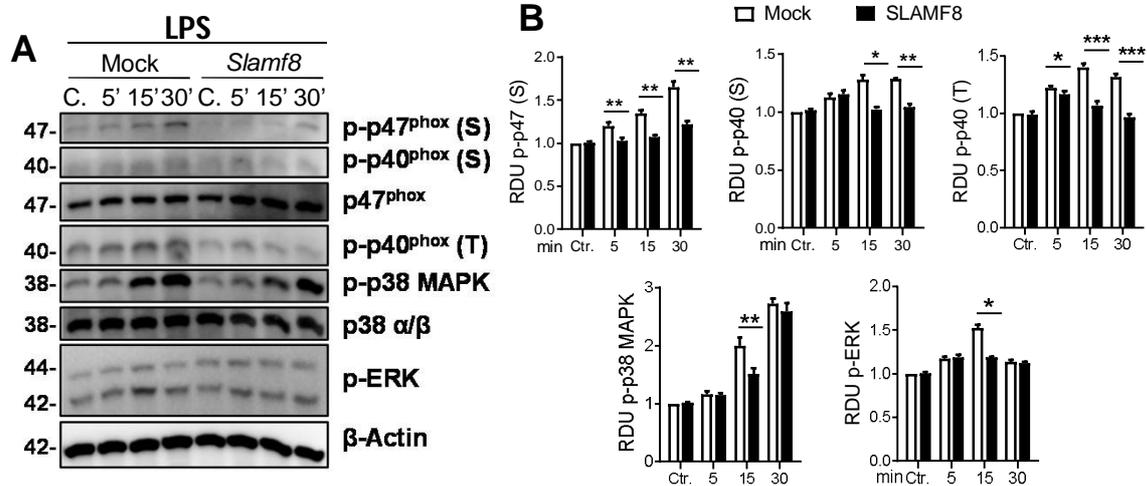


Figure S9. Study of NOX2 activation through phosphorylation analysis of p47^{phox}, p40^{phox} and p38/ERK MAPK in *Slamf8* or mock-transfected RAW264.7 Mφ. Stimulations with LPS. Stable clones isolated from RAW264.7 Mφ transfected with cDNA encoding Myc-tagged Slamf8 (■) or mock transfected cells (□) were activated with 10 μg/ml LPS at different times. **(A)** Representative western blots of indicated phosphorylated proteins are shown. Results of one out of three independent experiments are shown. **(B)** Relative expression of the indicated proteins as indicated in A. Phosphorylation levels were normalized to appropriate loading control and are graphically represented. Values indicate mean ± SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Ctr., control; RDU, relative densitometry units; Ser/S: Serine; Thr/T, Threonine.