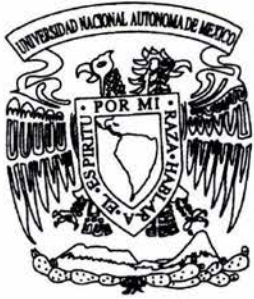


11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Papel de CD13 (Aminopeptidasa N) en la activación de monocitos humanos a través de receptores para inmunoglobulina”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
Paola Mina Osorio**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Enrique Ortega Soto**



**MEXICO, D. F., 2005**

0352130



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

A mi esposo Daniel, por su amor y apoyo incondicionales

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Paola Mina Osorio

FECHA: 8 SEPTIEMBRE 2005

FIRMA: Paola Mina Osorio

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirme realizar mis sueños. Le pido que algún día, alguno de mis presentes o futuros hallazgos pueda ser utilizado en el alivio de un dolor, en el tratamiento de alguna enfermedad o que de alguna forma sirva para que alguien mejore su calidad de vida. De otra manera, para mí, todo el esfuerzo habrá sido vano.

Al Dr. Enrique Ortega, quien más que mi tutor ha sido mi mejor amigo y mi sostén. Sus capacidad para decir las palabras precisas en los momentos precisos, su solidaridad, su humildad y su paciencia son cualidades que espero aprender de él algún día. Ni en toda la vida podré pagarle por todo lo que ha hecho por mí en todos los aspectos de mi vida.

A mis padres Luis y Adiel, por enseñarme el sentido de la responsabilidad, la entrega, la honestidad y la lucha por los ideales. Por ser la muestra viva de que se predica mejor con el ejemplo que con mil palabras. Por su apoyo incondicional en cada paso de mi vida. Por el amor y abnegación con los que han entregado su vida a nosotras.

A mi hermana Anamilena, por ser un ejemplo de paciencia y solidaridad. Porque me ha hecho sentir su respaldo y comprensión a cada paso. Porque sé que cuento con ella siempre y para todo.

A mis suegros Humberto y Margoth, porque han sido como mis segundos padres. Sin su apoyo jamás hubiera sido posible culminar esta meta. A mis segundos abuelitos Cristóbal y Rosita, por el gran amor que me han demostrado y por el gran apoyo que me han dado.

A todos mis tíos, quienes a través de la distancia han estado siempre conmigo respaldándome a cada paso y demostrándome que cuento con ellos siempre.

A mis amigos mexicanos Erika y Octavio, Rodrigo, Gaby y Cristal, Yenitzel y Erin, Ana, Teresita y todos los que con su amistad han compartido con nosotros esta estancia en México.

A mis amigas Katty, Jhockonda, Carol y Mercy, por haber mantenido nuestra entrañable amistad y haberme hecho sentir su apoyo permanente aún a través de la distancia.

A los miembros pasados y presentes del laboratorio del Dr. Ortega que de una forma u otra han formado parte de este trabajo, pero especialmente a la Dra. Isabel Soto, a Claudia Garay y a la Sra. Raquel por toda su ayuda durante los cuatro años de mi estancia en México.

A los miembros de mi comité tutorial, Leopoldo Santos y Gloria Sodevila, por todas sus contribuciones a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Linda H. Shapiro por su valiosa aportación a la segunda parte del proyecto y por permitirme ser parte de su laboratorio para trabajar en éste y otros proyectos.

A mi esposo Daniel, por su gran amor. Por estar conmigo en los buenos y malos momentos enseñándome que los malos, jamás lo son tanto. Por su ejemplo de entereza, de amor por los ideales, de rectitud y de responsabilidad. Por su apoyo y su compañía.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado una oportunidad que en mi país no pude tener. Ha sido un orgullo ser parte de ella y estaré eternamente agradecida por lo que en ella he aprendido.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Fue financiado por los proyectos UNAM (213701), CONACYT (41092) y PAPIIT-UNAM (IN 220705). P.M.O recibió el apoyo de una beca de posgrado otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Cuando se indica, los experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Linda H. Shapiro, Departamento de Biología Celular, University of Connecticut Health Center.

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1 Receptores para inmunoglobulina G.....	3
1.2 Genes .....	4
1.3 Clasificación.....	4
1.4 Estructura .....	4
1.5 Transducción de señales .....	8
1.6 Funciones .....	10
1.7 Similitudes entre FcRs y otros receptores de reconocimiento inmune. Moléculas de coestimulación.....	11
1.8 Fagocitosis.....	19
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>4. AMINOPEPTIDASA N (CD13). ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS (PRIMERA PARTE)</b> .....	<b>27</b>
5.1 El CD13 redistribuye a las copa fagocítica durante la fagocitosis mediada por FcγRs y es internalizado hacia los fagosomas .....	28
5.2 La coagregación de FcγRI con CD13, incrementa la capacidad fagocítica de las células monocíticas.....	33
5.3 La coagregación de FcγRI con CD13 prolonga la fosforilación de la cinasa Syk.....	35
5.4 CD13 colocaliza parcialmente y co-redistribuye con el FcγRI .....	38
<b>6. CONCLUSIONES (PRIMERA PARTE)</b> .....	<b>41</b>
<b>7. RESULTADOS (SEGUNDA PARTE)</b> .....	<b>48</b>
7.1 El anticuerpo monoclonal anti-CD13 452, induce agregación homotípica en la línea celular U-937 de una manera dosis y tiempo-dependientes.....	49
7.2 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 para inducir agregación homotípica no correlaciona con su capacidad para inhibir la actividad enzimática de CD13.....	51
7.3 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 para inducir agregación homotípica correlaciona con su especificidad de unión a epítopos específicos .....	57
7.4 La expresión en membrana de CD13 pero no la de moléculas de adhesión disminuye durante la agregación homotípica.....	58



7.5	Efecto de anticuerpos monoclonales anti-CD29, CD11a, CD18, CD54 y CD98 en la agregación homotípica mediada por CD13.....	58
7.6	Requerimientos metabólicos de la agregación homotípica mediada por CD13.....	62
7.7	CD13 redistribuye a la zona de contacto célula-célula durante la agregación homotípica.....	64
8.	<b>CONCLUSIONES (SEGUNDA PARTE)</b> .....	67
9.	<b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	72
10.	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	74
10.1	Células y anticuerpos .....	74
10.2	Monocitos humanos de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos. ....	75
10.3	Fagocitosis por microscopía confocal de escaneado con láser.....	75
10.4	Fagocitosis selectiva CD13/FcγRI .....	76
10.5	Análisis de la fosforilación de Syk inducida por coagregación de FcγRs y CD13 .....	77
10.6	Colocalización y coreistribución por microscopía confocal .....	78
10.7	Ensayos de agregación homotípica .....	78
10.8	Ensayos de competencia entre anticuerpos anti-CD13 por inmunofluorescencia.....	79
10.9	Determinaciones de actividad enzimática de aminopeptidasa .....	80
10.10	Localización subcelular de CD13 por microscopía confocal en tiempo real .....	80
11.	<b>REFERENCIAS</b> .....	81
	<b>APENDICE I: Abreviaturas</b> .....	92
	<b>APENDICE II: Artículos publicados</b> .....	94

## RESUMEN

Así como la activación de las células de la inmunidad adaptativa a través de sus receptores de reconocimiento inmune (MIRRs) es estrictamente regulada por moléculas llamadas de coestimulación e inhibición, la activación de células de la inmunidad innata a través de sus MIRRs (los receptores para inmunoglobulinas, FcRs), también es susceptible de regulación. El conocimiento de los mecanismos de esta regulación es de gran relevancia pues permitirá diseñar terapias dirigidas a su regulación *in vivo*. Sin embargo, en monocitos humanos, tales mecanismos han sido prácticamente inexplorados. En el presente trabajo, se evaluó el papel de la aminopeptidasa N (CD13) en la regulación de la activación de monocitos mediada por FcRs utilizando como modelo una de sus funciones más importantes: la fagocitosis. Se encontró que CD13 redistribuye activamente a la copa fagocítica durante la fagocitosis mediada por FcRs indicando su participación activa en el proceso. Esto se traduce funcionalmente en que la fagocitosis que se lleva a cabo en presencia de CD13 es más eficiente que aquella que ocurre a través de los FcRs solos. La posible explicación bioquímica del fenómeno es una prolongación de la fosforilación de la cinasa Syk. Se sugiere que el mecanismo por el cual CD13 actúa como molécula de coestimulación podría ser la estabilización del contacto célula-célula. Así, en el presente trabajo se describe por primera vez un papel de CD13 en adhesión de monocitos, realizándose una caracterización inicial de dicho papel a través del estudio de la agregación homotípica inducida por anticuerpos anti-CD13. En conjunto, los hallazgos presentados en este trabajo demuestran un papel de CD13 en la activación de monocitos humanos a través de FcRs y sugieren varios de los mecanismos involucrados.

## SUMMARY

Multichain immune recognition receptors (MIRRs)-mediated activation of cells of the adaptive immune response is strictly regulated by costimulatory and inhibitory molecules. In the same manner, innate immune response cell activation mediated by MIRRs (immunoglobulin receptors, FcRs) is susceptible of regulation. Knowledge of the mechanisms of regulation of the immune response is of great relevance in the development of drugs aimed at its regulation *in vivo*. However, the mechanisms regulating MIRRs-mediated activation of cells of the innate immune response have been almost unexplored. In this work, we evaluated the role of Aminopeptidase N (CD13) in the regulation of the activation of monocytic cells through FcRs using one of the most important FcR-mediated functions as a model: phagocytosis. We found that CD13 actively redistributes to the phagocytic cup during the FcR-mediated phagocytosis suggesting its active participation in this process. This translates functionally in an increase in the phagocytic capacity of monocytes when they bind to their targets through CD13 and FcRs instead of FcRs alone. The biochemical explanation of this phenomenon is a prolongation in the Syk phosphorylation peak. This kinase is considered the most important one in the Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. Additionally, it is suggested that the mechanism for the CD13 costimulatory capacity is a stabilization of the cell-cell contact (phagocyte-target contact). Also, in this work, it is described for the first time, a role for CD13 in adhesion phenomenon on human monocytes by the study of anti-CD13 mAbs-induced homotypic aggregation. Together, the findings presented here demonstrate a role for CD13 in the FcR-mediated monocytic cell activation and suggest some of the mechanisms involved.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Receptores para inmunoglobulina G

Una parte crucial de la respuesta inmune es la producción de anticuerpos específicos (inmunoglobulinas) contra el antígeno agresor. Una vez que los anticuerpos secretados reconocen al antígeno, necesitan unirse a las células efectoras quienes finalmente, a través de la internalización del complejo antígeno-anticuerpo, se encargarán de la destrucción del antígeno, su procesamiento y presentación. Esta unión a las células se lleva a cabo gracias a la presencia de receptores para anticuerpos presentes en la membrana celular. Cuando el complejo antígeno-anticuerpo se une a los receptores se produce su agregación en la membrana, lo cual desencadena una serie de señales que permiten la internalización del antígeno por diversos mecanismos que se discutirán más adelante. Se han descrito receptores para la porción Fc (FcRs) de cada uno de los tipos de inmunoglobulina (Van Vugt y Van de Winkel, 2001; Hulett y Hogarth, 1997). Así, existen Fc $\alpha$ Rs (para IgA), Fc $\epsilon$ Rs (para IgE), Fc $\delta$ Rs (para IgD) y Fc $\gamma$ Rs (para IgG). Estos últimos, los Fc $\gamma$ Rs, se encuentran en el humano como glicoproteínas de membrana y como receptores solubles generados ya sea por procesamiento alternativo de sus transcritos o por proteólisis de los receptores de membrana. Los Fc $\gamma$ Rs de membrana se expresan en casi todos los leucocitos (**Tabla 1**). El presente trabajo involucra únicamente a los Fc $\gamma$ Rs de membrana y de éstos, sólo a aquéllos expresados en monocitos y macrófagos humanos.

## 1.2 Genes

Existen 8 genes que codifican para FcγRs, todos localizados en el cromosoma 1. Los receptores que codifica cada uno de ellos y sus isoformas se resumen en la **Tabla 2**.

## 1.3 Clasificación

Los FcγRs pueden clasificarse de acuerdo a su afinidad por la porción Fc de la IgG en dos grupos:

- FcγRs de alta afinidad:
  - FcγRIA,  $K_a = 10^8$ - $10^9$  M<sup>-1</sup> y,
- FcγRs de baja afinidad:
  - FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC ( $K_a = <10^7$  M<sup>-1</sup>)
  - FcγRIIIA ( $K_a = 2 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>), FcγRIIIB ( $K_a = <10^7$  M<sup>-1</sup>)] (Van Vugt, 2001 y Hulett y Hogarth, 1994).

Desde el punto de vista funcional, se clasifican en receptores activadores (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA,B), e inhibidores (FcγRIIB).

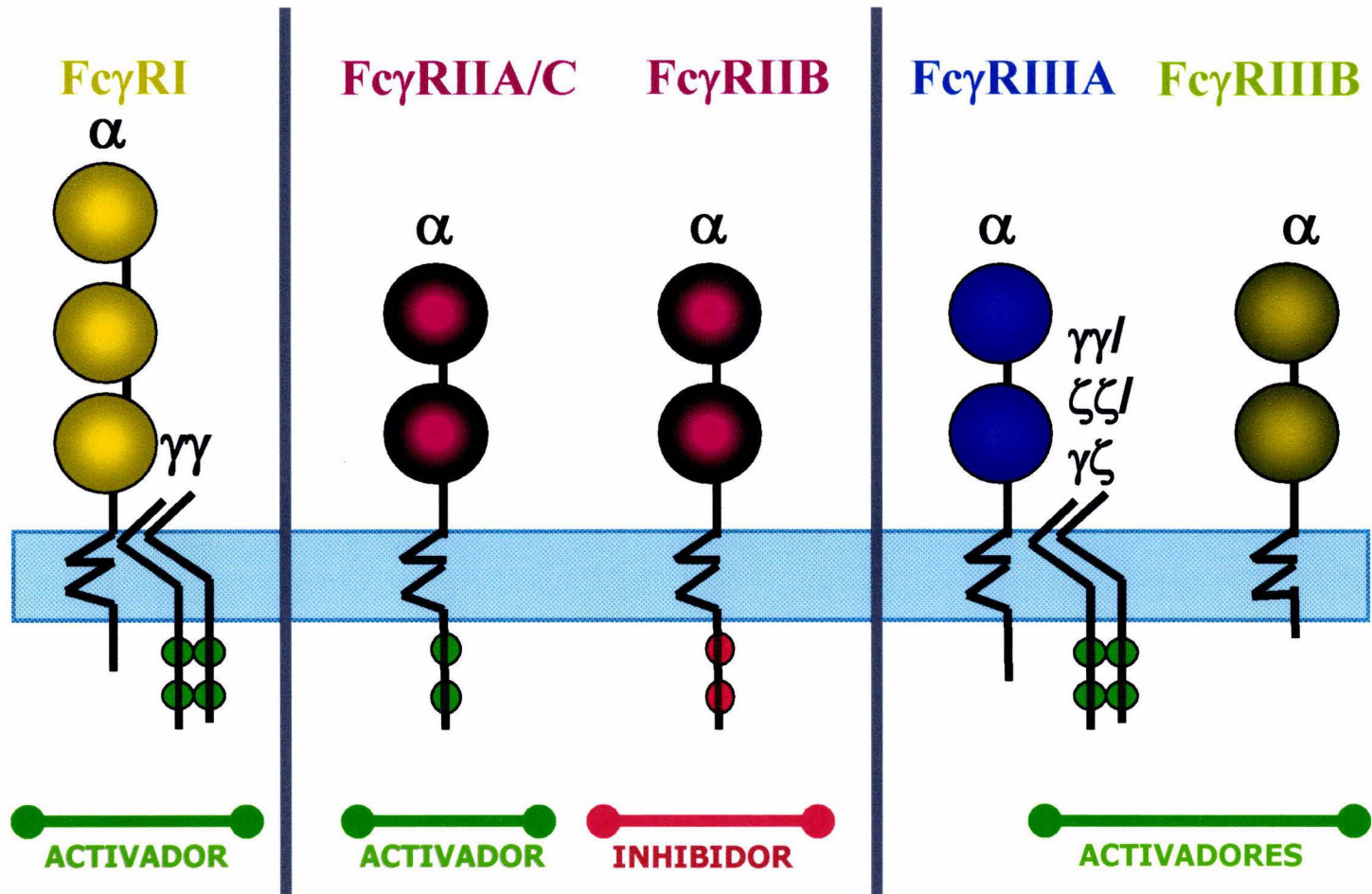
## 1.4 Estructura

Los FcγRs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Están formados por una cadena α (FcRα) para unión al ligando (IgG) y un dímero de cadenas asociadas no

covalentemente a la cadena  $\alpha$  y unidas entre sí por enlaces disulfuro ( $\gamma$  en células mieloides ó  $\zeta$  en células linfoides) que contiene, en su región intracitoplasmática, la secuencia consenso necesaria para la transducción de señales (ver más adelante). La cadena  $\gamma$  se identifica como Fc $\gamma$ R. En el caso de los receptores de tipo II (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIC), la secuencia consenso se encuentra localizada en la región intracitoplasmática de la cadena  $\alpha$ , por lo que éstos receptores carecen de cadenas asociadas (**Figura 1**).

<b>Tabla 1. EXPRESIÓN Y FUNCIONES DE Fc<math>\gamma</math>Rs EN LEUCOCITOS HUMANOS</b>		
<b>Tipo de Fc<math>\gamma</math>R</b>	<b>Expresión constitutiva en:</b>	<b>Funciones</b>
Fc $\gamma$ RI	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas.	Fagocitosis, endocitosis, presentación de antígeno, CCDA, estallido respiratorio, secreción de citocinas.
Fc $\gamma$ RIIA	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células de Langerhans.	Endocitosis, CCDA, estallido respiratorio, secreción de citocinas.
Fc $\gamma$ RIIB	Monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, linfocitos B y linfocitos T particularmente del tipo $\gamma/\delta$	Endocitosis, regulación negativa de linfocitos B, macrófagos y basófilos
Fc $\gamma$ RIIC	Monocitos, macrófagos, neutrófilos	Citotoxicidad en células NK
Fc $\gamma$ RIIA	Macrófagos, neutrófilos, linfocitos T $\gamma/\delta$ , células NK y ciertas poblaciones de monocitos.	Fagocitosis, endocitosis, CCDA, estallido respiratorio, secreción de citocinas, apoptosis.
Fc $\gamma$ RIIB	Neutrófilos	CCDA, estallido respiratorio, degranulación.

**Tabla 1.** Los distintos tipos de Fc $\gamma$ Rs se expresan en los mismos tipos celulares y desempeñan funciones similares. CCDA, Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos.



**FIGURA 1. Estructura esquemática de los Fc<sub>γ</sub>Rs.** Los Fc<sub>γ</sub>Rs son glicoproteínas de membrana formadas por una cadena alfa de unión a la IgG y donde se indica, un dímero de cadenas asociadas. Las esferas amarillas representan dominios de inmunoglobulina que forman el dominio extracelular de la cadena alfa (α). Las regiones transmembranales están constituidas por hélices alfa. Los círculos pequeños representan las secuencias consenso de señalización presentes, en los dímeros de cadenas asociadas (γγ) o en el propio dominio intracitoplásmico de la cadena alfa en el caso de los Fc<sub>γ</sub>RII. Los círculos verdes representan ITAMs. Los rojos, ITIMs. Nótese cómo el Fc<sub>γ</sub>RIIIA puede asociarse con homodímeros de cadenas γ o ζ. El Fc<sub>γ</sub>RIIIB, por su parte, se asocia al Fc<sub>γ</sub>RIIIB o a receptores de complemento (CR3) para transducir la señal.

<b>Tabla 2. FcγRs. GENES, PROTEÍNAS, NOMENCLATURA</b>			
<b>TIPO DE RECEPTOR</b>	<b>GENES: Número y denominación</b>	<b>ISOFORMAS (TRANSCRITOS): Número y denominación</b>	<b>PROTEÍNAS DESCRITAS: Número y denominación</b>
FcγRI	3: IA, IB, IC	4: Ia, Ib1, Ib2, IC	2: Ia (membranal), sIb1, sIc1 (solubles)
FcγRII	3: IIA, IIB, IIC	6: IIa1, IIa2 IIb1, IIb2, IIb3, IIc	5: IIa (membranal), sIIa2 (soluble), IIb1, IIb2, IIc (membranales).
FcγRIII	2: IIIA, IIIB	2: IIIa, IIIb	2: IIIa, IIIb (membranales), sIIIa, sIIIb (solubles generados por corte proteolítico de los membranales).

**Tabla 2.** Como se observa, los distintos genes que codifican para FcγRs se denominan utilizando el número romano que indica el tipo de receptor y una letra mayúscula que indica el gen correspondiente. Los transcritos de cada gen se identifican por letras minúsculas que representan las isoformas (transcritos) descritas para cada receptor. La letra proviene de aquélla que identifica el gen y el número indica los distintos transcritos del mismo gen. A nivel de proteína, se utiliza la misma nomenclatura que a nivel del transcrito. Sin embargo, ciertos transcritos generan proteínas de membrana mientras que otros generan proteínas secretadas debido a procesamiento alternativo del mensajero, a codones de paro en la secuencia antes de la región génica que codifica para el dominio transmembranal del receptor o, en otros casos como el del FcγRIII, por corte proteolítico de la proteína. Los receptores solubles se identifican con la letra “s” como prefijo (Hulett y Hogarth, 1994; Van Vugt y Van de Winkel, 2001; Ravetch y Kinetic, 1991).

La cadena alfa está formada por un dominio extracelular que contiene dos o tres dominios de inmunoglobulina tipo V. A continuación hay una región transmembranal con estructura alfa hélice y una región intracelular corta en el caso del receptor de alta afinidad FcγRI (31 aa) y más larga en el caso de los receptores de tipo II (76 aa en el caso del FcγRIIa1, 94 aa para FcγRIIb1 y 47 en el del FcγRIIb2). Estos últimos contienen la secuencia consenso responsable de la transducción de señales de activación o inhibición en su región intracelular. Finalmente, el FcγRIIIb, se encuentra anclado a la membrana a través de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Däeron, 1997; Salmon *et al.*, 1996).



## 1.5 Transducción de señales

El evento intracelular más temprano que ocurre tras la agregación de Fc $\gamma$ Rs en la membrana celular es la propia fosforilación de los receptores. La cascada de señalización inducida a continuación, depende del tipo de secuencia consenso presente en el dominio intracelular de los receptores o de sus cadenas asociadas. Así, es de tipo activadora si la secuencia consenso involucrada es un ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), o de tipo inhibidora si la secuencia es un ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (Daëron, 1995 y 1997; Hulett y Hogarth, 1994).

El receptor de alta afinidad (Fc $\gamma$ RI) y el receptor Fc $\gamma$ RIIIA, poseen secuencias de activación (ITAMs) en cadenas  $\gamma\gamma$  ó  $\gamma\gamma/\gamma\zeta$  respectivamente, asociadas a la cadena  $\alpha$  principal responsable de la unión al ligando. Los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIC, también funcionan como activadores, pero poseen el ITAM en su propia cola citoplasmática por lo que no es necesaria su asociación con cadenas accesorias para inducir una respuesta celular. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB también posee la secuencia ITIM en su propia cola citoplasmática (Ravetch y Bolland, 2001). Estructuralmente, el ITAM, consiste en dos pares de tirosinas y leucinas en la secuencia consenso D/EX<sub>7-8</sub>D/EX<sub>2</sub>-YXXL/I-X<sub>7-12</sub>-YXXL/I, donde X es cualquier aminoácido. El ITIM, en cambio, contiene una sola secuencia YXXL dentro de la secuencia consenso AENTITYSLLKHP (Hulett y Hogarth, 1994; Daëron, 1997).

La fosforilación de los ITAMs, se relaciona con la activación de varios tipos de cinasas intracelulares. El primer grupo de ellas es el de la familia Src, representada en monocitos por lck, lyn y hck (Ghazziadeh *et al.*, 1994 y Durden *et al.*, 1995). Un segundo grupo de cinasas activadas, luego de la agregación de Fc $\gamma$ Rs, es el de la familia de Syk/Zap-70, representada en monocitos por Syk. Una vez activada la cinasa Syk, se inician una serie de cascadas de señalización que conducen a uno o varios de los siguientes fenómenos: a)

incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, b) activación de isoformas de PKC y c) estimulación de transcripción de varios genes a través de la vía de Ras (Rosa, *et al.*, 2003). En el primer fenómeno, incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la responsable es la cinasa PLC $\gamma$  que a su vez activa a PKC y al ciclo del inositol fosfato a través de la generación de diversos metabolitos. Uno de ellos, el metabolito Inositol trifosfato (IP3), es el encargado de inducir la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de su unión a receptores en el retículo endoplásmico. En el caso de la activación de la transcripción de genes, se ha demostrado que la vía de Ras se activa a través de interacciones entre el factor de intercambio de nucleótidos Sos y la molécula adaptadora Grb2. A continuación se desencadena una cascada en la cual Ras fosforila a Raf, quien a su vez fosforila a cinasas MEK las cuales hacen lo propio con MAP cinasa. MAP cinasa es la responsable de la activación de diversos factores de transcripción que conducen a la inducción de expresión de genes. Uno de los más importantes y mejor estudiados es el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Galandrini *et al.*, 1996).

En resumen, el modelo aceptado en la actualidad de la activación de los Fc $\gamma$ Rs consiste en los siguientes pasos:

- a) Agregación de los receptores en la membrana celular
- b) Fosforilación de las tirosinas de los ITAMs por parte de cinasas de la familia Src.
- c) Asociación de la cinasa Syk a las tirosinas fosforiladas de los ITAMs. Mediante ésta asociación se incrementa la actividad catalítica de Syk.
- d) Fosforilación y activación de moléculas intracelulares como PLC $\gamma$ , PI3-K, MAPK, etc. (los substratos implicados dependen de la función celular a desencadenarse, del tipo celular, del tipo de Fc $\gamma$ R agregado y del estado de diferenciación celular).
- e) Inicio de la función efectora (ver siguiente sección).

## 1.6 Funciones

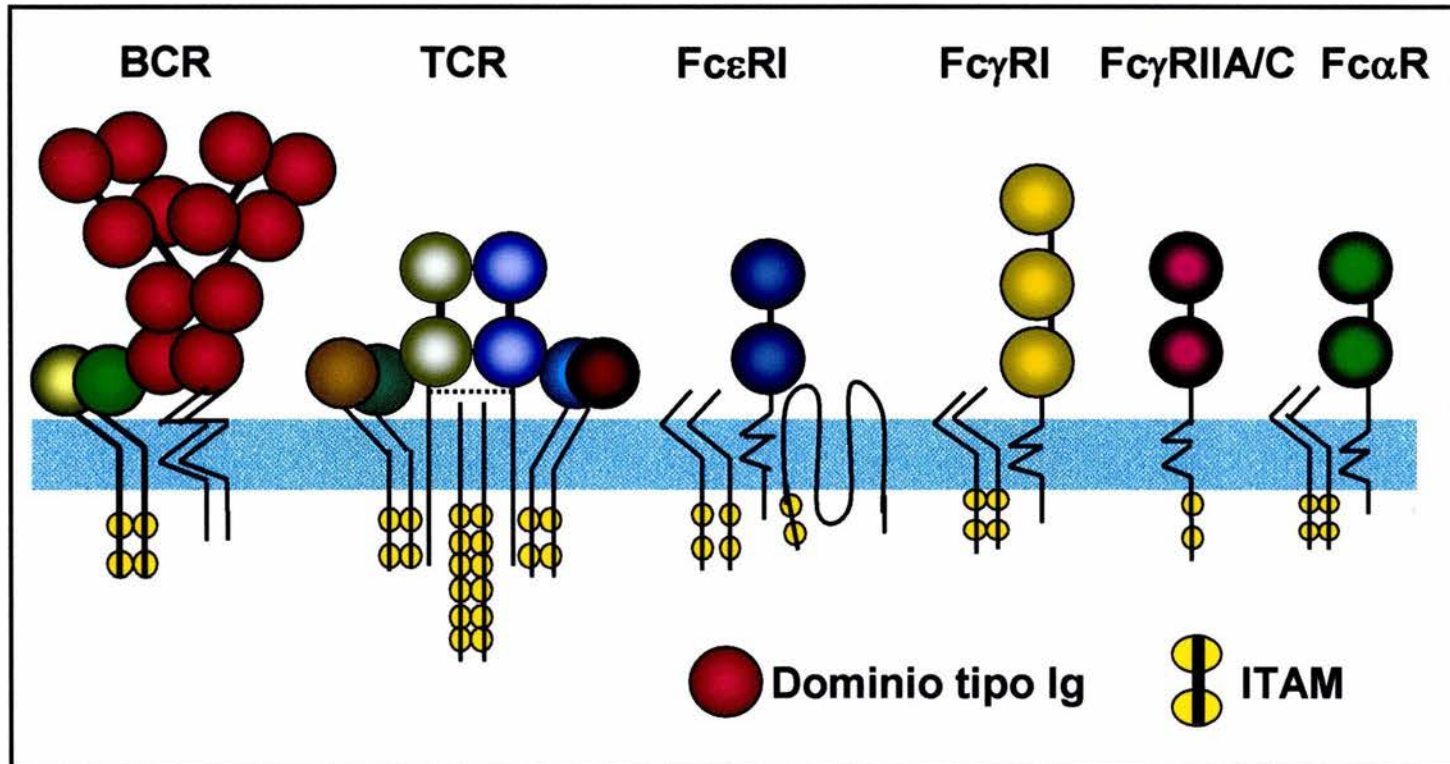
Las funciones en las que se ha involucrado a los Fc $\gamma$ Rs y que se llevan a cabo como consecuencia de su oligomerización en la membrana celular tras la unión a inmunocomplejos de IgG por los mecanismos de señalización resumidos en la sección anterior, son muy diversas. Entre las más importantes se encuentran: fagocitosis, endocitosis mediada por receptores, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), regulación de la respuesta inmune, aclaramiento de inmunocomplejos, regulación de la transcripción de genes de citocinas y péptidos proinflamatorios, entre otras (Clynes y Ravetch, 1995; Cox y Greenberg, 2001; Takai, 2002; Ioan-Fascinay *et al.*, 2002; Daëron, 1997). Esta gran versatilidad funcional, es decir, el hecho de que en determinadas circunstancias la activación de Fc $\gamma$ Rs resulte en una respuesta biológica específica, es una característica fundamental de los Fc $\gamma$ Rs (**Tabla 1**); sin embargo, carecemos de una explicación clara para ello. Es claro que en algunos casos se debe al tipo celular de que se trate, es decir, un mismo tipo de Fc $\gamma$ R puede inducir respuestas distintas en células distintas. Sin embargo, el tipo celular no es el único determinante de la respuesta pues células del mismo linaje responden de manera distinta en circunstancias distintas. Entre los factores que probablemente contribuyen a esta gran capacidad funcional se han propuesto: su alto grado de heterogeneidad, esto es, la expresión diferencial de sus distintas isoformas en distintos tipos celulares, el estado de activación y diferenciación de las células en las que se expresan, el nivel de agregación de los receptores tras el contacto con el inmunocomplejo y la posibilidad de interacciones funcionales con otras moléculas, siendo ésta última posibilidad la menos explorada.

### **1.7 Similitudes entre FcRs y otros receptores de reconocimiento inmune. Moléculas de coestimulación**

Los FcRs pertenecen a la familia de receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs, siglas en inglés de Multichain Immune-Recognition Receptors). Otros dos miembros de la misma familia, son el receptor de antígeno de células T (TCR) y el receptor de antígeno de linfocitos B (BCR) (**Figura 2**).

Los MIRRs comparten entre ellos varias características. En primer lugar, todos son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. En segundo lugar, todos llevan a cabo el reconocimiento del antígeno ya sea de manera directa como en el caso del BCR y el TCR o, en el caso de los FcRs, a través de una inmunoglobulina soluble que tras reconocer el antígeno, se une a éstos MIRRs presentes en células de la inmunidad innata como monocitos, macrófagos, neutrófilos, células cebadas, células dendríticas y eosinófilos (“células accesorias”). En tercer lugar, todos comparten mecanismos muy similares de transducción de señales. Tal como fue descrito para los FcRs en la sección anterior, todos los miembros de la familia de los MIRRs utilizan secuencias consenso de activación basadas en tirosina (ITAMs) para desencadenar la respuesta efectora tras su agregación en la membrana celular (Keegan y Paul, 1992; Daëron, 1997; Sigalov, 2004).

Varios estudios han demostrado la similitud estructural y funcional entre las cadenas de señalización asociadas a los FcγRs y aquellas asociadas a los otros MIRRs. Incluso se considera que las cadenas  $\gamma$  y  $\zeta$  junto con las cadenas  $\eta$  del complejo TCR-CD3, forman una familia de moléculas (Orloff *et al.*, 1990). Se sabe que las cadenas  $\gamma$  de los FcRs (FcR $\gamma$ ) y las cadenas  $\zeta$  del TCR (TCR $\zeta$ ) son codificadas por genes relacionados localizados en el cromosoma 1q23-24 en humanos, el cual también contiene los genes que codifican para el FcγRII y FcγRIII (Küster *et al.*, 1990; Weissman *et al.*, 1988; Le Conait *et al.*, 1990).



**FIGURA 2. Receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs).** Los receptores que participan en reconocimiento antigénico en leucocitos comparten características estructurales y funcionales. Todos pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (las esferas grandes representan dominios de inmunoglobulina). Además, todos disparan similares cascadas de señalización a través de las secuencias consenso ITAM (Tyrosine-based Activation Motifs).

Además, se ha demostrado que la cadena TCR $\zeta$  puede reemplazar a la FcR $\gamma$  en el Fc $\gamma$ RIIIA de células NK humanas (Lanier *et al.*, 1989). También ha sido reportado el hecho de que los ITAMs de la TCR $\zeta$  son fosforilados tras la agregación del Fc $\gamma$ RIIIA en células NK (Vivier *et al.*, 1991) lo cual apoya la conclusión de que además de su similitud estructural, pueden llegar a ser funcionalmente intercambiables.

La transducción de señales de activación, generada a través de las secuencias consenso de las cadenas accesorias, permite la activación celular y por tanto marca el inicio de la respuesta inmune tras el reconocimiento antigénico. Sin embargo, una respuesta inmune adecuada ocurre sólo tras la generación de dos señales. En el caso de los MIRRs de células de la inmunidad adaptativa (BCR y TCR), tras la primera señal constituida por el reconocimiento específico del antígeno (Ag) presentado por la célula presentadora de Ag, ocurre una segunda señal desencadenada como consecuencia de la participación de otras moléculas de membrana denominadas moléculas de coestimulación. En ausencia de ésta segunda señal, no sólo que la respuesta inmune puede no ser desencadenada sino que si lo es, puede ocurrir un fenómeno de activación incompleta que tiene como consecuencia la apoptosis de la célula en proceso de activación o su conversión en una célula incapaz de responder a estímulos subsecuentes (anérgica) (Frauwirth y Thompson, 2002). Así por ejemplo, las señales generadas por las moléculas de coestimulación como CD40 o ICOSL (Coestimuladora Inducible de Linfocitos) en la APC a través de su unión a CD40L (CD154) e ICOS en el linfocito, o por el sistema B7/CD28 (Lenschow *et al.*, 1996), se consideran indispensables para la completa y adecuada activación de los linfocitos (Frauwirth y Thompson, 2002; Chambers, 2001; Weintraub y Goodnow, 1998). En este contexto, el fenómeno de coestimulación ha sido definido como una interacción que potencia la señal inducida por el MIRR. Para algunos autores, se trata de moléculas que transducen una señal por sí solas, la cual es independiente del MIRR pero que sirve para incrementar o potenciar la señal generada por él. Para otros, se trata de la

interacción de moléculas que aún sin tener capacidad estimuladora por sí misma, actúan sinérgicamente con el MIRR para permitir una completa activación celular disminuyendo su umbral de activación. En éste último caso estarían incluidas las moléculas de adhesión. Éstas actúan estabilizando el contacto entre la APC y la célula que posee el MIRR (linfocito T ó B) incrementando la avidéz del contacto célula-célula (linfocito T-APC). Una vez incrementada la adhesividad del contacto, se requiere menor dosis antigénica para lograr una activación completa. En otras palabras, disminuye el número de complejos TCR-MHC necesarios para lograr una activación máxima. El ejemplo mejor estudiado de éste tipo de moléculas es el de la integrina CD11a/CD18 (lymphocyte-function associated-1 (LFA-1) y su ligando la molécula de adhesión intercelular-1 (CD54, ICAM-1). Se ha reportado que la ocupación de LFA-1 disminuye la dosis estimuladora mínima de antígeno en 10 a 100 veces (Kuhlman, *et al.* 1991). Desde este punto de vista, muchos autores sugieren establecer una diferencia entre moléculas de coestimulación y moléculas de adhesión. Sin embargo, se ha reportado que las moléculas de adhesión como LFA-1/ICAM-1 no sólo incrementan la avidéz del contacto célula-célula, sino que se ha propuesto un fenómeno de transducción de señal independiente, aunque es aún controversial (Abraham *et al.*, 1999). En suma, podríamos definir aquí un efecto coestimulador como toda aquella señal que ya sea que se genere por una molécula con capacidad intrínseca para la señalización o no, intersecta con la señal estimuladora del MIRR, potenciándola.

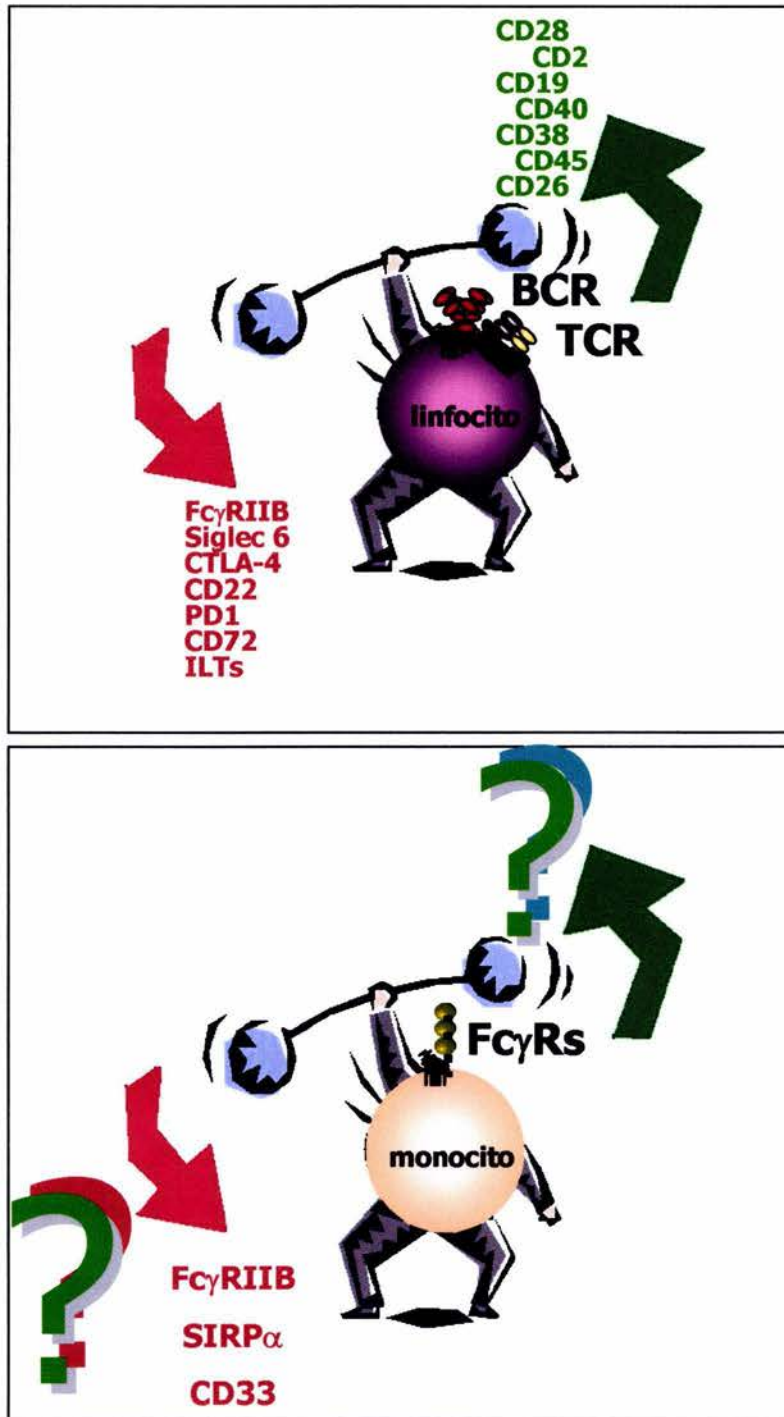
En el otro lado del espectro y para hacer más estricta la regulación de los fenómenos de activación, existe otro grupo de moléculas denominadas por algunos autores “moléculas de coinhibición” cuyo objetivo, considerado uno de los pilares de toda respuesta inmune, es la limitación de dicha respuesta. En el caso de los monocitos/macrófagos y de los propios linfocitos, la regulación de sus MIRRs ha sido atribuida casi exclusivamente a uno de los miembros de su propia familia, el Fc $\gamma$ RIIB. Así, se conoce con relativo detalle el mecanismo

por el cual el receptor inhibitor FcγRIIB, es capaz de regular negativamente la activación celular inducida por otros MIRRs (Däeron *et al.*, 1995). De igual manera, ya se han descrito parcialmente las consecuencias funcionales de la coagregación de los propios FcγRs activadores con el FcγRIIB (Däeron, 1997). También se han una serie de otras moléculas de coinhibición para los MIRRs de linfocitos (Lanier, 2001; Sinclair, 1999).

En suma, en la actualidad es bien conocido que la estimulación de linfocitos por el BCR y el TCR es modulada (positiva o negativamente) por la ocupación simultánea de otras moléculas de membrana (también conocidas como coreceptores). En cambio, los posibles mecanismos de regulación de los MIRRs de células de la inmunidad innata han sido prácticamente inexplorados (**Figura 3**). Si bien se ha demostrado modulación de ciertas respuestas inducidas por la agregación de los FcγRs, como fosforilación en tirosina de múltiples proteínas celulares o flujo de Ca<sup>2+</sup>, por parte de moléculas como CD33 (Siglec-3) (Ulyanova *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2001) o tetraspaninas (Lebel-Binay *et al.*, 1995; Worthington *et al.*, 1990), las consecuencias funcionales de estos procesos se desconocen. Uno de los pocos casos en que las implicaciones funcionales de la cooperación entre FcγRs y otras moléculas se han estudiado es aquél de la proteína reguladora de la señalización α (SIRPα). En éste caso, el papel es crucial pues la inhibición de la eritrofagocitosis mediada por FcγRs, por parte de SIRPα, se ha considerado responsable de evitar el desarrollo de anemia hemolítica en ratones (Oldenborg *et al.*, 2001).

En la respuesta inmune innata, dadas las similitudes antes descritas entre los MIRRs de linfocitos y los de células “accesorias”, sería lógico suponer que mecanismos de coestimulación y coinhibición de características similares son necesarios para la regulación de la activación celular. Durante los mecanismos efectores de la inmunidad innata, el contacto célula-célula o célula-substrato es tan importante como lo es en la llamada “sinapsis inmunológica” que se ha descrito entre la APC y el linfocito durante la respuesta adaptativa,





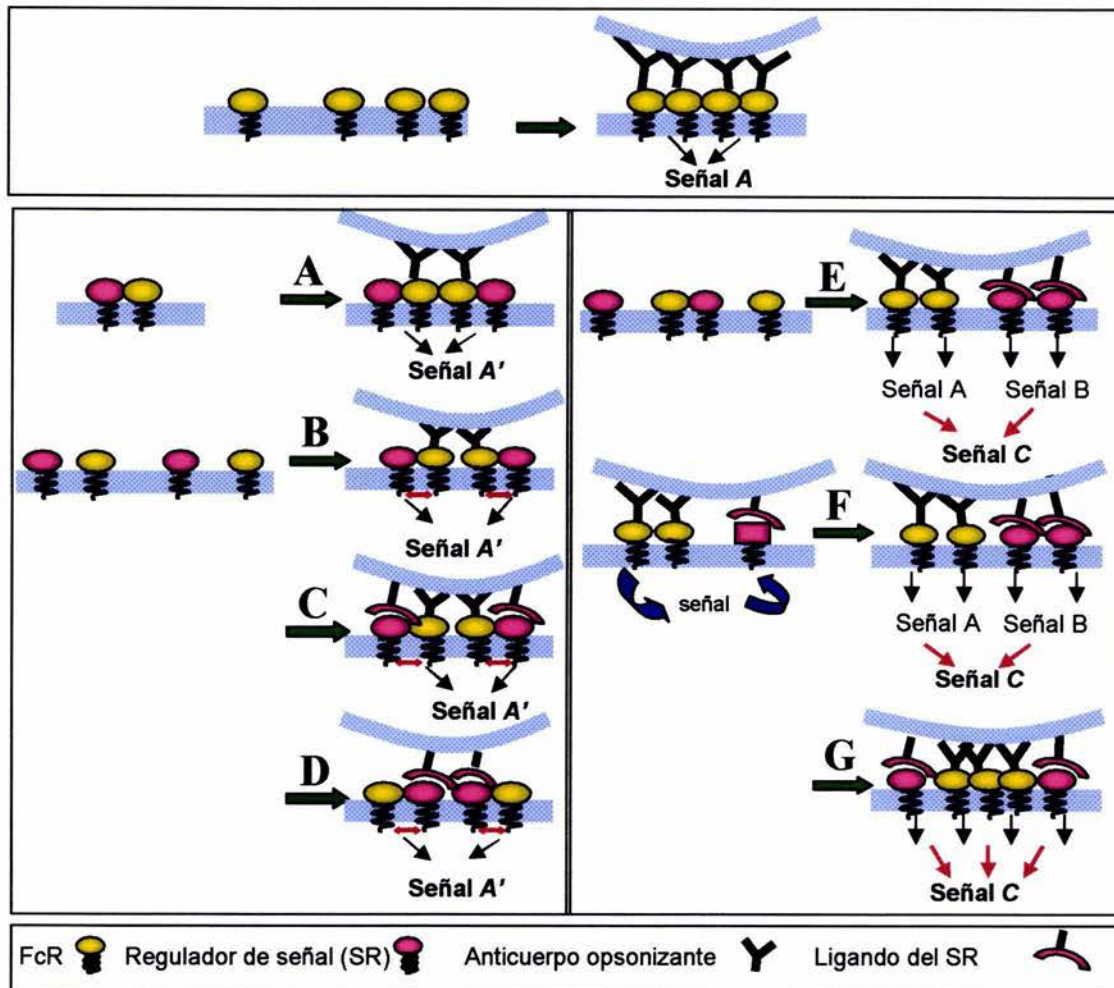
**FIGURA 3.** A pesar de las similitudes estructurales entre los MIRRs de linfocitos (dibujo superior) y los de monocitos (dibujo inferior), solamente en el caso de los primeros se conocen moléculas capaces de regular positiva o negativamente el fenómeno de activación. En el caso de los monocitos (dibujo inferior, las posibles moléculas de coestimulación o coinhibición prácticamente se desconocen (ver texto).

teniendo en cuenta que durante la respuesta adaptativa son precisamente las células “acesorias” quienes proveen al linfocito la segunda señal. Sin embargo, es en funciones efectoras independientes de la inmunidad adaptativa, es decir independientes del contacto con el linfocito, en las que nos ha interesado determinar si ocurre, como es de esperarse, una regulación igualmente estricta.

En otras palabras, así como durante la respuesta inmune adaptativa la interacción de moléculas de coestimulación y coinhibición regulan las respuestas celulares, interacciones similares deben darse durante contactos célula-célula durante la respuesta innata como aquél de la célula fagocítica con su blanco, aquél de la célula NK con una célula tumoral u otro blanco, aquél del monocito o neutrófilo con células endoteliales durante su migración hacia una zona de inflamación y, en general, de cualquiera de las células de la inmunidad innata con células de otros tejidos o con microorganismos, previo a su internalización para la consecuente presentación antigénica e inicio de la respuesta adaptativa.

Basándonos en los mecanismos conocidos de coestimulación en células de la inmunidad adaptativa, así como en reportes existentes que sugieren algún tipo de regulación de FcRs por parte de otras moléculas de membrana, hemos propuesto los posibles mecanismos por los cuales la regulación de la activación mediada por FcRs en monocitos podría llevarse a cabo tanto por moléculas con capacidad intrínseca para la señalización como por ejemplo, lectinas de unión a ácido siálico (Siglecs), transcritos tipo inmunoglobulina (ILTS) y proteínas reguladoras de la señalización (SIRPs); como por moléculas sin capacidad de señalización intrínseca como las de la familia de las tetraspaninas (Mina-Osorio y Ortega, 2004 y **Figura 4**).

El presente proyecto pretendió evaluar la cooperación entre Fc $\gamma$ Rs y otras moléculas de membrana, utilizando como modelo una de las funciones mediadas por Fc $\gamma$ Rs que más atención ha atraído por su importancia biológica: la fagocitosis.



**FIGURA 4. Posibles mecanismos de modulación de la señalización mediada por FcRs por parte de Reguladores de señal (SR).**

**Panel superior:** En ausencia de un regulador de señal (SR), la agregación de los FcRs induce una señal que llamaremos "A".

**Panel izquierdo:** Regulador de señal sin capacidad de señalización intrínseca (ej. Tetraspaninas) A. Asociación constitutiva entre el FcR y el SR. La agregación de los FcRs induce la coagregación pasiva del SR generándose una señal A modulada: A'. B. La agregación de los FcRs, induce la coagregación de un SR en ausencia de su ligando. Los complejos FcR-SR inducen una señal modulada A'. C. Una partícula opsonizada con Ig contiene también un ligando para el SR induciendo así la coagregación de este último con los FcRs. Se genera otra vez una señal modulada A'. D. La unión del SR a su ligando induce la coagregación de FcRs en ausencia de una Ig opsonizante. El SR utiliza la maquinaria de señalización del FcR para inducir una señal A'.

**Panel derecho:** SR con capacidad intrínseca para señalización (ej. Siglecs, SIRPs, ILTs) E. La unión independiente pero simultánea de los FcRs y los SR a sus ligandos respectivos genera un entrecruzamiento de sus señales individuales A y B respectivamente generando una señal final "C". F. La agregación de los FcRs genera una señal de adentro hacia afuera (inside-out) que cambia la afinidad y/o actividad de un SR. La señal inducida por el SR se entrecruza con la señal inducida por el FcR generándose una señal final C. G. La interacción simultánea del FcR y del SR con sus ligandos respectivos estabiliza la interacción del blanco con la célula y por tanto la interacción del FcR con la partícula opsonizada con Ig. La señal resultante es una señal modulada C.

## 1.8 Fagocitosis

La fagocitosis se define como el fenómeno de internalización de partículas de más de 0.5  $\mu\text{m}$  que ocurre a través de un mecanismo dependiente de actina pero independiente de clatrina. Esto permite su diferenciación de otros mecanismos de internalización como la pinocitosis y la endocitosis mediada por receptores. Así, la pinocitosis es la internalización de partículas pequeñas, usualmente fluidos y solutos y la endocitosis mediada por receptores es la internalización específica de partículas menores a 0.5  $\mu\text{m}$ , macromoléculas y virus. Ambos procesos comparten la característica de ser, al contrario de la fagocitosis, dependientes de clatrina e independientes de actina (Aderem y Underhill, 1999; Tse *et al.*, 2003).

Se considera que la mayor parte de células del organismo poseen cierta capacidad fagocítica. Sin embargo, un grupo de ellas, llamado de fagocitos “profesionales” posee la máxima capacidad de internalización. A éste grupo pertenecen los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares. Algunos autores, han llamado a un grupo de células con capacidad fagocítica intermedia, fagocitos “no profesionales” o “paraprofesionales”. Entre ellos se encuentran el epitelio de la retina y el epitelio vesical (Ravinovitch, 1995).

Pero, ¿cuál es la característica que les confiere a ciertas células una mayor capacidad fagocítica que a otras? La respuesta más aceptada es la presencia de receptores específicos en los fagocitos profesionales que les permiten ampliar su eficiencia de internalización así como su capacidad de reconocimiento de blancos fagocíticos. A esta conclusión se ha llegado por estudios que muestran que la transfección de receptores para fagocitosis como FcRs en células epiteliales y fibroblastos, les confiere a éstas células una capacidad fagocítica incrementada (Indik *et al.*, 1995).

Sin embargo, también se acepta que otras características deben diferenciar a las células con alta y baja capacidad para la fagocitosis. La fagocitosis es un fenómeno muy complejo en

el que participan un gran número de moléculas y mecanismos de señalización que varían de acuerdo al receptor inductor y a la partícula a ser fagocitada. Así, se han descrito un gran número de receptores para fagocitosis y además un gran número de mecanismos distintos de internalización de acuerdo a la identidad de la partícula a ser fagocitada. Como consecuencia, el clásico mecanismo de “zipper” descrito en 1975 por Griffin y colaboradores, ha quedado restringido a ciertos tipos de fagocitosis y se ha demostrado que la fagocitosis de microorganismos como *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Salmonella*, *Shigella*, entre otros, ocurre por mecanismos llamados “no convencionales” de internalización (Rittig *et al.*, 1999). A pesar de que aún existe controversia en cuanto a si algunos de éstos tipos “no convencionales” de fagocitosis ocurren *in vivo*, a si ocurren preferentemente en fagocitos no profesionales y a si pueden ocurrir a través de receptores específicos, estos hallazgos han ampliado la idea de que el fenómeno de fagocitosis es mucho más complejo de lo que se consideraba y aún más, la idea de que algún grado de especificidad debe requerirse para desencadenar mecanismos de fagocitosis distintos de acuerdo al tipo de partícula a ser fagocitada.

Además, estos hallazgos han llevado a la conclusión de que las moléculas de membrana que participan en el fenómeno de internalización no son simplemente “acarreadas” por la internalización de una parte de la membrana plasmática sino que más bien, únicamente las moléculas necesarias para un determinado tipo de fenómeno de internalización, acuden a la zona de fagocitosis (copa fagocítica) mientras que aquéllas no requeridas, son excluidas de dicha región. De ésta manera, la antigua concepción de que durante la fagocitosis se lleva a cabo la internalización de grandes segmentos de la membrana, y con ella a manera de embudo, todas las moléculas expresadas en ese segmento de membrana, ha quedado completamente descartada. La idea actual, considera que moléculas específicas son reclutadas con una temporalidad exacta con el fin de activar un mecanismo de internalización especial de acuerdo al tipo y tamaño del blanco fagocítico. Esta idea se apoya en resultados que muestran

que el fenómeno de fagocitosis es altamente localizado. Por ejemplo, se ha observado que aún la fagocitosis de microorganismos invasivos como *Salmonella typhimurium*, que ocurre por uno de los mecanismos “no convencionales”, se desencadena por la secreción y translocación de la proteína bacteriana SopE que conduce a alteraciones del citoesqueleto que están claramente confinadas al sitio exacto de unión de la bacteria al fagocito (Wood *et al.*, 1996). Además, se ha demostrado que el exceso de membrana requerido durante la internalización para la generación de los fagosomas, proviene de membranas de organelos intracitoplasmáticos como el retículo endoplásmico (RE), y no de la membrana plasmática como se creía. De acuerdo con ello, se ha reportado la existencia de fenómenos de exocitosis durante la fagocitosis como mecanismo para proveer a la célula con una cantidad de membrana suficiente para llevar a cabo la internalización. Este fenómeno a su vez le permite depositar las moléculas necesarias para el proceso en el sitio exacto (Booth *et al.*, 2001, Greenberg, 1999, Gagnon *et al.*, 2002).

Muchos otros trabajos apoyan la idea de que la fagocitosis es un proceso altamente específico. Entre ellos se encuentran los reportes de Koval *et al.*, 1998; Dermine *et al.*, 2001 y Ueyama *et al.*, 2005. En el primero de ellos, se hizo un análisis de las diferencias en los mecanismos de señalización desencadenados por partículas de distintos tamaños, opsonizadas con IgG durante su fagocitosis. Interesantemente, la conclusión fue que la célula es capaz de discriminar entre tamaños de blancos fagocíticos, activando mecanismos de internalización distintos según el tamaño de la partícula a ser fagocitada. Además, demostraron diferencias no sólo en las fases iniciales del proceso fagocítico (durante la formación de la copa fagocítica), sino en las fases posteriores, durante la fusión de fagosomas y lisosomas.

En el segundo caso, los estudios del grupo de Dermine y colaboradores demostraron por primera vez que una molécula presente en la membrana fagosomal no provenía de la poza de dicha molécula en la membrana plasmática sino que se asociaba selectiva e

independientemente al fagosoma. Dicha molécula es la flotilina, que se considera un marcador de balsas de lípidos de la membrana plasmática. Las balsas de lípidos juegan un importante papel tanto estructural como funcional en el fagosoma. Por tanto, se había asumido que la flotilina encontrada en los fagosomas provenía de la internalización de balsas de lípidos hacia el fagosoma durante el proceso de fagocitosis. Sin embargo, éstos estudios mostraron cómo es la flotilina proveniente aparentemente de la vía endosomal la que se asocia selectivamente con los fagosomas y cómo el parásito *Leishmania donovani* es capaz de inhibir dicha asociación aún cuando el proceso de fagocitosis, con todo y la supuesta internalización de una parte de la membrana plasmática, procedía normalmente.

Finalmente, Ueyama et al. muy recientemente demostraron cómo las tres isoformas de la proteína Rac se asocian al fagosoma con una temporalidad exacta: primero Rac1, luego Rac3 y finalmente Rac2. Interesantemente, el mecanismo responsable de esta temporalidad de la asociación está relacionado con la carga positiva neta de cada una de las isoformas. Así, el retardo de Rac2 para asociarse al fagosoma se debe a que debido a su carga, Rac2 se asocia primero a endomembranas y a continuación éstas se fusionan con el fagosoma. Éste y otros estudios han demostrado que la participación específica de una de las isoformas de Rac o el orden en que participan en la fagocitosis depende del estímulo fagocítico y del tipo celular en que se desarrolle.

De esta manera, éstos y otros autores, además de demostrar que se requiere un altísimo grado de coordinación espacial y temporal entre todas las moléculas participantes para completar un fenómeno de fagocitosis de manera adecuada, validaron el uso de la microscopía confocal como herramienta para la determinación de la participación de moléculas específicas durante la fagocitosis bajo la premisa de que dada la selectividad de dicho proceso, toda aquélla molécula que se observa redistribuyendo activamente a la copa fagocítica, participa directamente en la fagocitosis. Así, los estudios de Allen y Aderem

(1996), realizados por microscopía confocal, demostraron que la fagocitosis desencadenada por receptores específicos envía señales específicas hacia el citoesqueleto de actina. Durante la fagocitosis mediada por el receptor de manosa, se reclutan a la copa fagocítica, F-actina, talina, PKC $\alpha$ , miosina I entre otras moléculas pero no vinculina ni paxilina, las cuales sí son reclutadas cuando la fagocitosis es mediada por FcRs o receptores del complemento. Finalmente, la especificidad del fenómeno de fagocitosis, se apoya también en los hallazgos sobre la participación de los receptores tipo toll (TLRs) en la fagocitosis mediada por FcRs, que claramente confiere a la fagocitosis un cierto grado de especificidad que le permite el reconocimiento de patrones específicos de patógenos determinados (Underhill *et al.*, 1999).

En conclusión, la capacidad fagocítica de una célula depende de muchos factores pero claramente requiere de la participación simultánea y selectiva de una gran variedad de moléculas que dirigen y regulan el mecanismo y especificidad del proceso.

## **2. HIPÓTESIS**

Las funciones efectoras mediadas por Fc $\gamma$ Rs pueden ser moduladas por los efectos coestimuladores o inhibidores de otras moléculas de membrana.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación de CD13 en la modulación de la activación de monocitos humanos a través de Fc $\gamma$ Rs.



#### 4. AMINOPEPTIDASA N (CD13). ANTECEDENTES

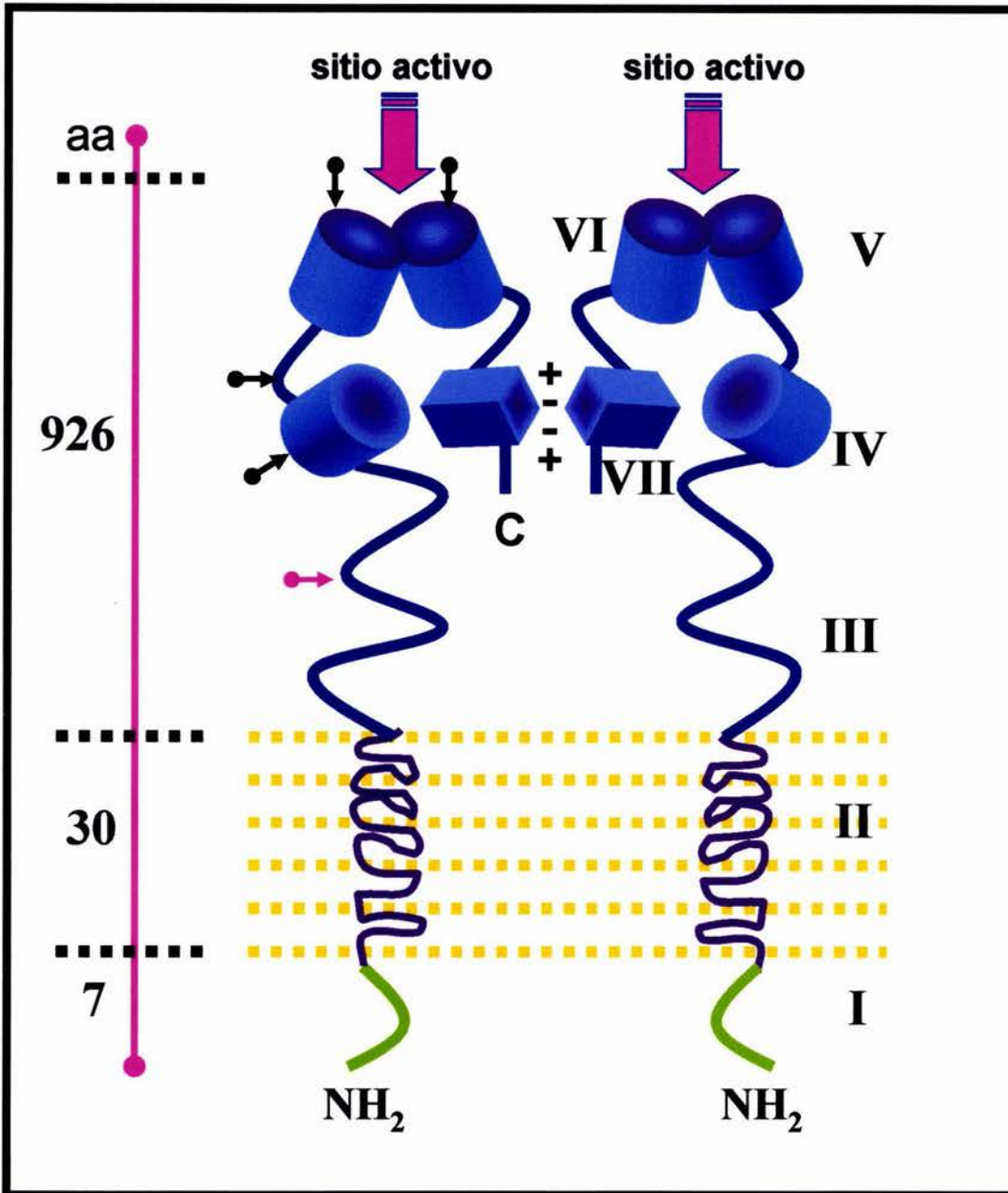
CD13 o aminopeptidasa N (APN), es una proteína de membrana de tipo II de 150 kD, altamente glicosilada. Se expresa predominantemente en células de linaje mielomonocítico pero también en células intestinales, en el riñón y en la placenta, así como en las células del sistema nervioso central (Look *et al.*, 1989; Olsen *et al.*, 1997 y 1988).

Enzimáticamente, es una aminopeptidasa de la familia de las gluzincinas (Hooper, 1994), es decir, depende de zinc para llevar a cabo su actividad enzimática. Dicha actividad ocurre predominantemente sobre aminoácidos aminoterminales neutros. El sitio activo se localiza entre los dominios V y VI de la proteína (**Figura 5**) y se ha predicho que está formada por un “pocket” o bolsillo tridentado dentro del cual se encuentra el dominio de unión al zinc caracterizado por el pentapéptido HEXXH (Sjöstrom *et al.*, 2000 y Ashmun *et al.*, 1992). Mutaciones del aminoácido que determina la unión al zinc inhiben la actividad enzimática, pero mutaciones de aminoácidos del pentapéptido que no bloquean la unión del zinc, también afectan dicha actividad. De ahí que se piensa que es necesaria la conformación tridimensional del pocket para que la actividad enzimática permanezca intacta. Esto explicaría por qué ciertos anticuerpos monoclonales (mAbs) que no impiden la unión del zinc ni se unen al sitio activo de la enzima, inhiben parcialmente la actividad enzimática (Ashmun *et al.*, 1992). Gracias a su actividad enzimática, el CD13 participa en la digestión de regiones amino de péptidos vasoactivos y quimiotácticos, citocinas, encefalinas y hormonas (Riemann *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 1990; Hoffman *et al.*, 1993; Chomarat *et al.*, 1995; Kanayama *et al.*, 1995).

CD13 actúa además como receptor de varios coronavirus como el virus de la gastroenteritis viral (TGEV) en porcinos y el 229E en humanos (Delmas *et al.*, 1994; Yeager *et al.*, 1992). Además ha sido propuesto como uno de los receptores del coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo severo SARS (Yu *et al.*, 2003). Participa en los

eventos iniciales de la interacción entre el citomegalovirus humano y la célula blanco (Larsson *et al.*, 1998; Sodeberg *et al.*, 1993) y en el procesamiento de antígenos (Larsen *et al.*, 1996, Amoscato *et al.*, 1998, y Dong *et al.*, 2000). CD13 ha sido también asociado con adhesión celular a componentes de la matriz extracelular (Menrad *et al.*, 1993); con motilidad celular en espermatozoides (Arienti *et al.*, 1997) y con transducción de señales a través de CD13 en monocitos (McIntyre *et al.*, 1989 y Navarrete-Santos *et al.*, 2000a). Así, se reportó que APN está implicada en vías de señalización en monocitos y células U-937 al caracterizar el incremento de calcio inducido por mAbs anti-CD13. Dicho incremento se asocia a fosforilación de las cinasas ERK1/2, JNK y p38 y se impide por la inhibición de cinasas de tirosina y de PI3-K. Sin embargo, CD13 posee un dominio intracitoplásmico muy corto (8-9 aminoácidos) por lo que se ha sugerido que para transducir una señal, requeriría de la asociación con alguna molécula de membrana cuya identidad se desconoce hasta el momento.

Una posible cooperación funcional entre CD13 y FcγRs, fue sugerida por primera vez en 1989, cuando McIntyre y colaboradores propusieron que el incremento de Ca<sup>2+</sup> inducido por anticuerpos anti-CD13 en la línea celular promonocítica humana U-937, podría resultar de la formación de complejos entre el antígeno (CD13) y los FcγRs. A esta conclusión se llegó por las siguientes observaciones: el efecto no podía ser reproducido usando fragmentos del anticuerpo y la magnitud del efecto variaba según el isotipo del anticuerpo anti-CD13. Sin embargo, ésta conclusión ha sido puesta en duda por reportes que indican que la inhibición de la actividad enzimática de CD13, que en principio no tendría por qué alterar la formación de los complejos CD13-FcγR, inhibe la señalización mediada por CD13 (Lohn *et al.*, 1997). De todas formas, ya que otro trabajo sugirió que la actividad enzimática no se requiere para la señalización mediada por CD13 (Navarrete-Santos, 2000b), la interacción CD13-FcγRs, no podía ser descartada.



**FIGURA 5. Esquema de la estructura hipotética de aminopeptidasa N (CD13).** La proteína está formada por un homodímero. Cada monómero orienta su extremo amino terminal (NH<sub>2</sub>) hacia la región intracitoplásmica y está dividido en 7 dominios indicados con números romanos en el monómero de la derecha. El número aproximado de aminoácidos (aa) que forma cada uno de los dominios se indica junto a la barra de la izquierda. La proteína se encuentra altamente glicosilada (~40% de la masa total), los sitios de glicosilación se indican con flechas en el monómero de la izquierda: N-glicosilación flechas negras y O-glicosilación flecha púrpura. Junto con los mismos sitios de glicosilación en el monómero opuesto, se han predicho un total de 10. El sitio de dimerización se muestra con los signos de carga (+--+). El sitio activo de la enzima se encuentra entre los dominios V y VI. (Adaptado de Sjöstrom et al, 2000 y Riemann et al, 1999).

En 1996, Tokuda y Levy encontraron una correlación positiva entre la expresión de CD13 en monocitos humanos y su capacidad fagocítica por microesferas de látex. Estos autores notaron que las células con mayor capacidad fagocítica (de la población de monocitos tomada de células mononucleares de sangre periférica), expresaban mayores niveles de CD13 (más del doble) que las células con menor capacidad para la fagocitosis. Además, mostraron que la inducción de la diferenciación de estas células con 1,25-dihidroxi-vitamina D3, la cual incrementa la capacidad fagocítica de los monocitos humanos, disminuye la expresión de CD13 pero sólo en células con baja capacidad fagocítica y no en aquéllas con alta capacidad para la fagocitosis. Estos resultados, claramente sugieren un papel de CD13 en la fagocitosis.

Por estas razones, se decidió evaluar la posible asociación funcional entre FcγRs y CD13 a través de varios métodos. El resultado fue la observación de que CD13 efectivamente, puede ser propuesto como una molécula de coestimulación (o regulador de señal) de FcγRs en monocitos humanos.

## **5. RESULTADOS (PRIMERA PARTE).**

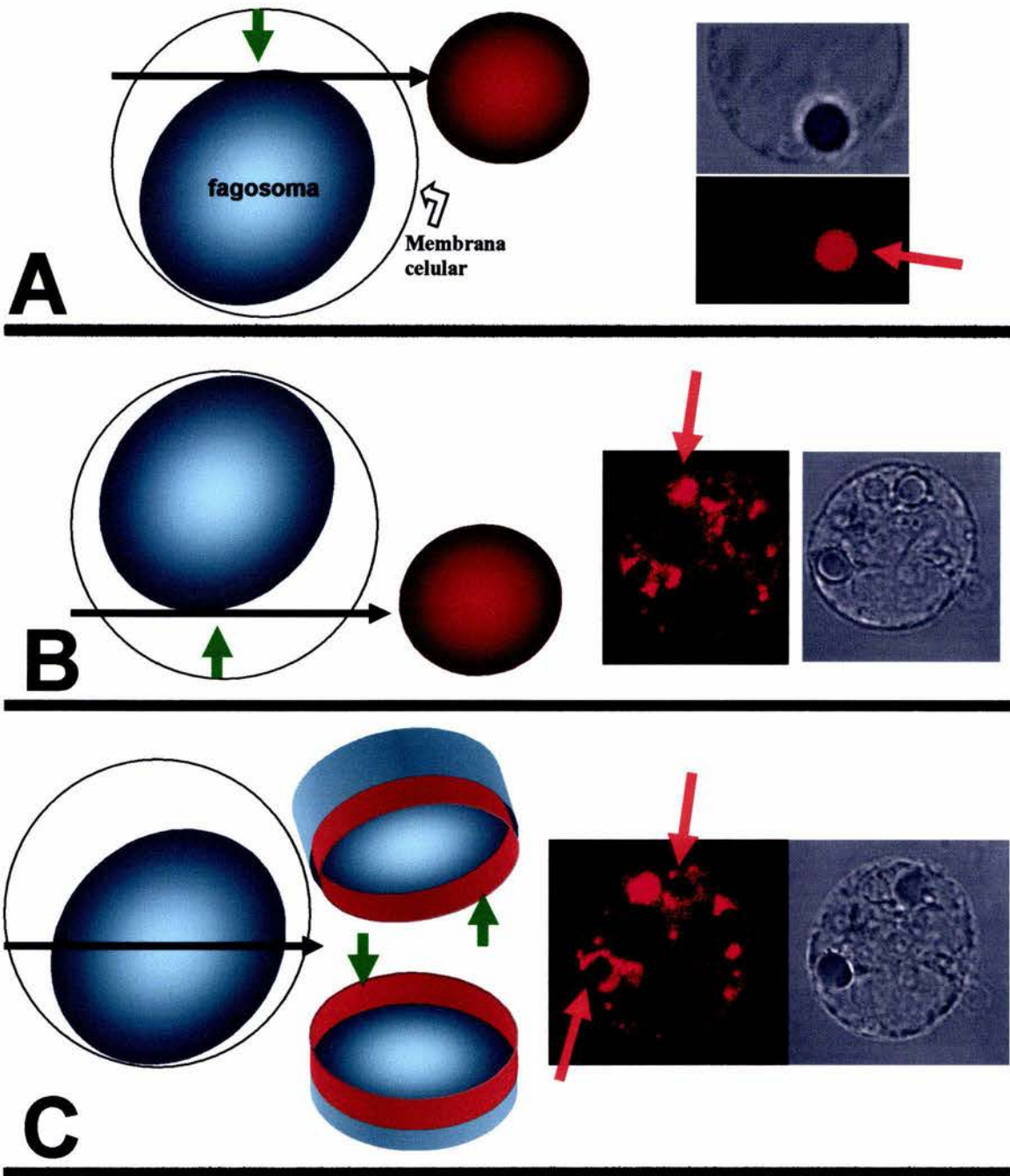
El papel de la molécula CD13 fue estudiada en cuanto a su papel como regulador de señal de FcγRs en células de la línea promonocítica U-937, en monocitos humanos aislados de sangre periférica y en macrófagos humanos derivados de monocitos. La línea celular U-937 fue utilizada porque todos los estudios previos en los que se había demostrado la capacidad de CD13 para la señalización, habían sido llevados a cabo en esa línea celular.

## **5.1 El CD13 redistribuye a las copa fagocítica durante la fagocitosis mediada por FcγRs y es internalizado hacia los fagosomas**

Se evaluaron por microscopía confocal los posibles cambios en la distribución subcelular de CD13 durante la fagocitosis mediada por FcγRs. Para ello, monocitos humanos aislados de sangre periférica de donadores sanos o monocitos de la línea celular U-937, fueron incubados con eritrocitos de carnero opsonizados con IgG marcada con FITC por diferentes periodos de tiempo. Es necesario anotar que los eritrocitos opsonizados de esta manera, inducen la agregación de todos los tipos de FcγRs expresados en la membrana celular de monocitos (i.e. FcγRI y FcγRII). En ausencia de un sistema de imagen en tiempo real, para visualizar a CD13 a diferentes puntos del proceso de fagocitosis, dicho proceso fue detenido transfiriendo los tubos del ensayo a 4°C o fijando las células con paraformaldehído 1% (PFA 1%). Bajo estas condiciones, las células fueron incubadas con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal anti-CD13 (clona 452) por 30 minutos. Alternativamente, en otros experimentos las células fueron incubadas con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> biotinilados que posteriormente fueron detectados con estreptavidina marcada con el fluorocromo Texas-Red.

Para una correcta interpretación de los datos, es conveniente aclarar que la distribución de una molécula en el fagosoma (detectada como en éste caso, con el anticuerpo monoclonal específico marcado con un fluorocromo), depende del plano de corte de la imagen confocal como se explica en la **Figura 6**.

La distribución de CD13 en la membrana de células U-937 antes de la fagocitosis se muestra en la **Figura 7A**. Luego de 60 minutos de incubación a 37°C, se observó una clara redistribución de CD13 hacia las zonas de contacto entre la membrana del monocito y la del eritrocito opsonizado (**Figuras 7B-D**). En los primeros momentos de la fagocitosis (formación de la copa fagocítica), CD13 se observó acumulado precisamente en aquéllas



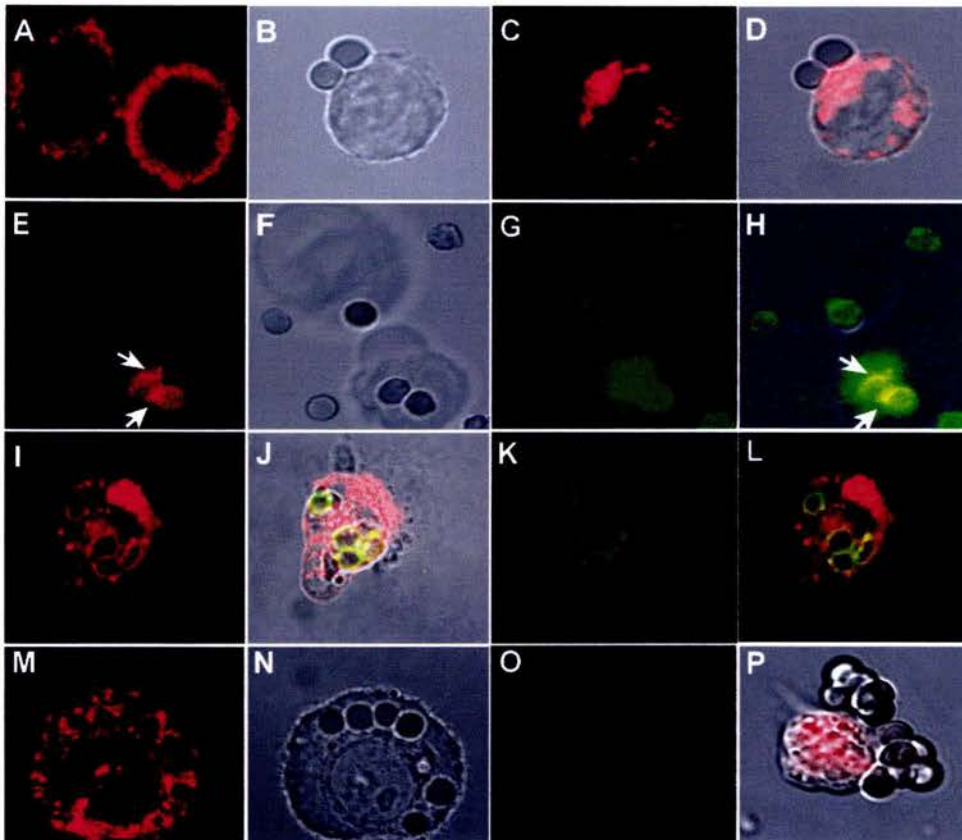
**FIGURA 6.** La visualización de la marca fluorescente en un fagosoma depende del plano de corte. **A.** En un corte celular que pasa por el borde superior de un fagosoma (flecha negra), la marca de una molécula presente en la membrana fagosomal aparecerá uniformemente distribuida en el fagosoma porque lo que se observa es la membrana desde arriba. La flecha verde indica la dirección desde la cual se observa el fagosoma en la imagen final. **B.** En un corte que pasa por el borde inferior, el resultado será el mismo que en A. **C.** Si el corte atraviesa transversalmente el fagosoma, se observará la membrana fagosomal y por tanto la marca fluorescente alrededor de la esfera fagosomal. Los círculos vacíos representan la membrana plasmática. La proporción fagosoma-célula se modificó en el esquema para fines didácticos.

zonas de la membrana que empezaban a formar la copa fagocítica para la internalización de los eritrocitos (**Figura 7E-H**) las cuales se observan en amarillo en la proyección presentada en la imagen 7H. Esta proyección se obtiene al rotar los datos de la imagen original alrededor del eje X obteniéndose una nueva imagen que permite la observación del objeto desde diferentes ángulos. En esta serie de imágenes (Figuras 7E-H), la marca fluorescente visible por fuera de los dos eritrocitos claramente visibles en la imagen de luz transmitida, corresponde a otros dos eritrocitos que se observan sólo levemente en este plano de corte. En los eritrocitos en foco, es evidente que la colocalización de CD13 con los FcγRs está restringida a las zonas de contacto entre la membrana eritrocitaria y aquella de la célula U-937.

En otras muestras, las células U-937 fueron pre-incubadas con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo y posteriormente con eritrocitos opsonizados con IgG marcada con FITC por períodos de 90 minutos para permitir la internalización total de los eritrocitos. En estos casos, los fagosomas resultantes se observaron completamente rodeados de la marca de CD13 (**Figura 7, imágenes I-L**). Esta internalización de CD13 también se observó con eritrocitos opsonizados con IgG no fluorescente (**Figura 7, imágenes M-O**), en cuyo caso no se detectó fluorescencia verde en el canal correspondiente bajo los ajustes del equipo necesarios para obtener una fluorescencia roja adecuada, lo cual descarta la posibilidad de detección cruzada de los fluorocromos.

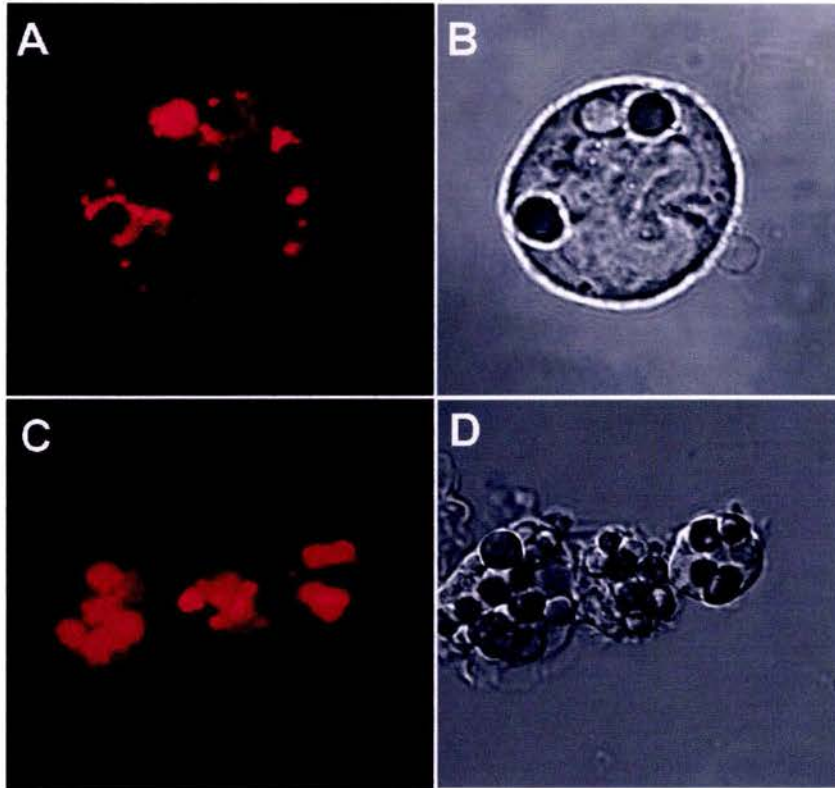
No se observó redistribución de CD13 a las zonas de contacto en células incubadas con eritrocitos opsonizados a 4°C de temperatura (**Figura 7P**).

El mismo fenómeno de redistribución se observó en monocitos humanos aislados de sangre periférica (**Figura 8A**) los cuales, como se esperaba, internalizan eritrocitos opsonizados con IgG de una manera mucho más eficiente. Como se observa en las **Figuras 8A y 8B**, de acuerdo al plano de corte, la marca de CD13 puede ser visualizada ya sea como



**FIGURA 7. CD13 redistribuye a la copa fagocítica durante la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ Rs en células U-937. A:** Distribución de CD13 en células previo a la fagocitosis. **B-D:** Las células U-937 fueron incubadas con eritrocitos opsonizados con IgG por 60 min a 37°C. Luego de fijar, el CD13 se detectó mediante fragmentos F(ab)<sup>2</sup> del anticuerpo marcado con TR. La imagen compuesta D, muestra la redistribución de CD13 a las zonas de contacto con los eritrocitos **E-H:** La células U-937 se incubaron con eritrocitos opsonizados con IgG fluoresceinada por 60 minutos a 37°C. Se enfriaron en hielo y se detectó el CD13 mediante incubación con los fragmentos del anticuerpo marcado con TR. El CD13 se observa en las zonas de la membrana en contacto con los eritrocitos (E, flechas blancas) Las membranas celulares se encuentran fuera de foco (ver imagen de luz transmitida F) lo que impide la detección de la distribución del resto de CD13 en la membrana en este plano de corte. Los eritrocitos aparecen fluorescentes en el canal verde (G). La proyección mostrada en la imagen H muestra en amarillo los sitios de colocalización entre los Fc $\gamma$ Rs (eritrocitos opsonizados con IgG) y el CD13 (flechas). **I-L:** Las células U-937 fueron incubadas con los fragmentos del mAb anti-CD13 marcado con TR a 4°C antes de la fagocitosis. Luego de lavar, se incubaron con los eritrocitos opsonizados con IgG marcada con FITC durante 90 minutos a 37°C. Los eritrocitos no internalizados se lisaron antes de la observación en el microscopio confocal. Los eritrocitos que aparecen internalizados en los fagosomas (J,K) se encuentran rodeados por CD13 (I). Las imágenes compuestas J y L muestran la colocalización de CD13 (señal roja) con los eritrocitos opsonizados con IgG-FITC (señal verde) en los fagosomas. **M-O:** Un experimento similar al mostrado en las imágenes I-L pero con eritrocitos opsonizados con IgG no fluoresceinada. El CD13 se ve observado dentro de los fagosomas (M). No se observa fluorescencia en el canal verde (O) **P:** Imagen compuesta que muestra la de luz transmitida y la del canal rojo de células incubadas con los fragmentos del anticuerpo antes de la incubación con eritrocitos opsonizados con IgG pero a 4°C durante los 60 minutos. El CD13 no redistribuye a las zonas de contacto con a esta temperatura.





**FIGURA 8. El CD13 redistribuye a la copa fagocítica durante fagocitosis mediada por  $Fc\gamma R$ s en monocitos humanos aislados de sangre periférica. A-B:** Los monocitos humanos fueron incubados con fragmentos  $F(ab)_2$  del anticuerpo anti-CD13 marcados con TR a  $4^{\circ}C$  antes de la fagocitosis. Luego de lavar, fueron incubados con eritrocitos opsonizados con IgG durante 15 minutos a  $37^{\circ}C$ . Los eritrocitos no internalizados fueron lisados antes de la observación en el microscopio confocal. Los fagosomas se observan completamente rodeados de CD13. La distribución de la marca de CD13 en los fagosomas puede ser visualizada ya sea uniformemente en los fagosomas (fagosoma central) o como un anillo que los rodea, dependiendo del plano de corte X-Y. **C-D:** Luego de 30 minutos, los fagosomas se observan completamente llenos de la marca de CD13.

una marca uniforme que cubre todo el fagosoma o como un anillo que rodea el fagosoma cuando el corte atraviesa un fagosoma transversalmente. Las **Figuras 8C y 8D** muestran monocitos humanos luego de 30 minutos de incubación a 37°C con eritrocitos opsonizados con IgG, con la mayor parte de la marca de CD13 que estuvo inicialmente en la membrana celular, ahora rodeando a los fagosomas.

Es importante anotar que tanto en monocitos humanos primarios como en células U-937, la marca roja fluorescente correspondiente al CD13 internalizado, se detectó a nivel perifagosomal, perinuclear y en el citoplasma (**Figuras 7M y 8A**).

## **5.2 La coagregación de FcγRI con CD13, incrementa la capacidad fagocítica de las células monocíticas**

Para analizar las posibles implicaciones funcionales de la redistribución de CD13 durante la fagocitosis mediada por FcγRs, nos enfocamos en el receptor activador de alta afinidad FcγRI. Esto se debe a que éste receptor, a diferencia del receptor activador FcγRII, no posee isoformas inhibitoras que pudieran, al ser coagregadas, dificultar la interpretación del posible efecto de CD13 en la señalización inducida por FcγRs. Por tanto, procedimos a comparar la capacidad fagocítica (expresada como índice fagocítico) de células que interactúan con partículas fagocitables a través del FcγRI sólo, del CD13 sólo o de ambas moléculas juntas. Para ello, tal como lo describo en la sección de metodología, utilizamos eritrocitos de carnero que fueron biotinilados, luego cubiertos con estreptavidina y finalmente opsonizados con fragmentos biotinilados de un anticuerpo anti-IgG de ratón. Los eritrocitos así tratados, serán llamados de aquí en adelante EBS-Abs. Al preincubar las células monocíticas con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-FcγRI solamente, anti-CD13 sólo o ambos anticuerpos), originados en ratón, los eritrocitos opsonizados con anticuerpo anti-IgG de

ratón, son fagocitados exclusivamente a través de la molécula de elección por lo que a éste sistema le llamamos fagocitosis selectiva.

Tanto en monocitos humanos de sangre periférica como en células U-937, el Fc $\gamma$ RI fue capaz de mediar fagocitosis de EBS-Abs. Sin embargo, cuando los EBS-Abs interactuaron con las células a través de los dos receptores, el Fc $\gamma$ RI y el CD13, la capacidad fagocítica de las células fue 220% mayor (n=6) que aquella obtenida a través de la interacción con el Fc $\gamma$ RI sólo (**Figura 9A**).

Se obtuvieron resultados similares al utilizar dos anticuerpos monoclonales anti-CD13 distintos (clona 452 y clona WM47, datos no mostrados) así como al utilizar anticuerpo completo versus fragmentos F(ab) $'_2$ . Como control, aquéllos EBS-Abs que interactuaron con las células U-937 a través de Fc $\gamma$ RI y de CD82, que es otra molécula altamente expresada en células U-937 que también se ha sugerido que coopera con Fc $\gamma$ Rs (Lebel-Binay *et al*, 1995), no fueron internalizados más eficientemente que el control (**Figura 9A**).

En monocitos humanos aislados de sangre periférica, los EBS-Abs que interactuaron a través de CD13 y Fc $\gamma$ RI simultáneamente, también fueron internalizados más eficientemente que aquéllos que interactuaron con el monocito a través del Fc $\gamma$ RI sólo (**Figura 9B**). A concentraciones de 10  $\mu$ g de cada anticuerpo, el índice fagocítico fue 48.41% mayor que el observado con el Fc $\gamma$ RI sólo (n=11). A pesar de que se observaron grandes diferencias en la capacidad fagocítica de células obtenidas de diferentes donadores, el efecto positivo de la coagregación de CD13 con Fc $\gamma$ RI fue claro en las células de todos los donadores probados (**Figura 9C**).

Sorprendentemente, los dos anticuerpos monoclonales anti-CD13 probados, indujeron internalización de EBS-Abs por sí solos con un índice fagocítico similar al observado a través del Fc $\gamma$ RI sólo ya sea al usar anticuerpos completos o sus fragmentos F(ab) $'_2$ . Para determinar la especificidad de esta fagocitosis, preincubamos las células con un anticuerpo monoclonal

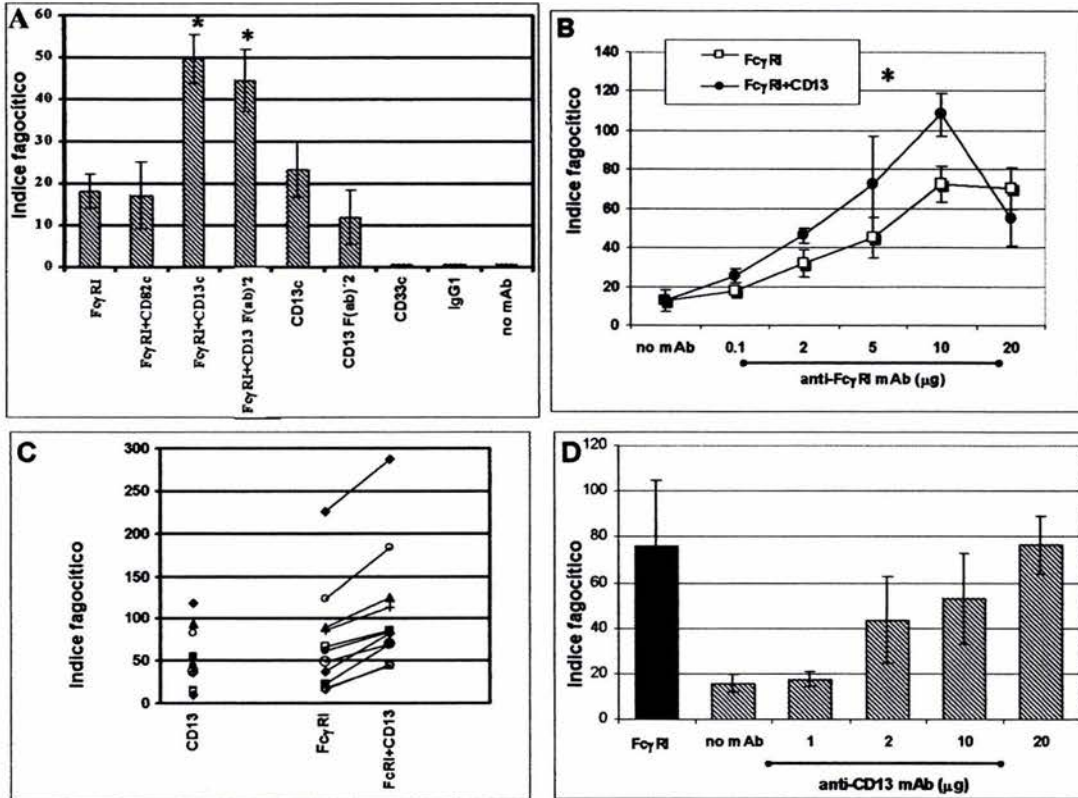
específico para CD33, -otra molécula altamente expresada en monocitos-, o con un anticuerpo monoclonal no relacionado (anti-DNP) del mismo isotipo. Ambas condiciones resultaron en índices fagocíticos que no fueron significativamente distintos de los que obtuvimos al incubar las células sin ningún anticuerpo como control negativo (**Figura 9A**) aunque sí se observó interacción entre los EBS-Abs y las células preincubadas con el anticuerpo anti-CD33. Adicionalmente, la fagocitosis mediada por CD13 es dosis-dependiente (**Figura 9D**).

Finalmente, evaluamos el efecto de la coagregación de CD13 con FcγRI en macrófagos derivados de monocitos. Estos macrófagos se obtuvieron al cultivar los monocitos humanos aislados de sangre periférica durante 6 días en presencia de suero autólogo. En estas células, el efecto fue aún mayor, con un incremento máximo de 250% en la capacidad fagocítica que además se observó con una dosis menor del anticuerpo anti-FcγRI (2μg). CD13 sólo también fue capaz de mediar fagocitosis en éstos macrófagos (cuadrados llenos en las **Figuras 10A y 10B**).

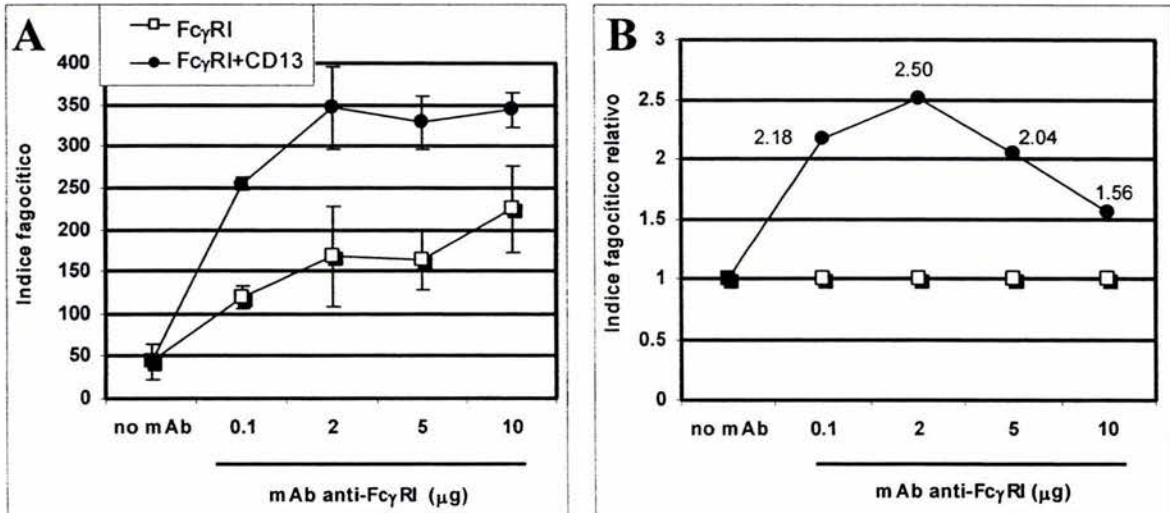
### 5.3 La coagregación de FcγRI con CD13 prolonga la fosforilación de la cinasa Syk

A continuación se determinó el efecto de la coagregación de FcγRI con CD13 en la señalización inducida por éste FcγR. Un paso crucial en la transducción de señales mediada por FcγRs es la activación de la cinasa de tirosina Syk. En consecuencia, examinamos la cinética de fosforilación de Syk en células U-937 estimuladas a través del FcγRI y la comparamos con aquella obtenida tras la co-agregación de FcγRI y CD13.

Como se observa en las **Figuras 11A y B**, el pico máximo de fosforilación de Syk al estimular a través del FcγRI sólo, se produce a los 3 minutos de estimulación. Este nivel de fosforilación empieza a disminuir a los 10 minutos. En cambio, al coagregar a CD13 con el



**FIGURA 9.** La coagregación de Fc $\gamma$ RI con CD13 incrementa la capacidad fagocítica de células U-937 y monocitos humanos aislados de sangre periférica. **A.** Células U-937 se incubaron con 10  $\mu$ g del mAb específico para la molécula indicada durante 30 minutos a 4°C. Luego de lavar, las células se incubaron por 90 minutos más a 37°C con eritrocitos opsonizados con fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> de anticuerpos biotinilados de cabra anti-IgG de ratón (EBS-Abs). Luego de lisis de los eritrocitos no internalizados, se cuantificó la fagocitosis por microscopía óptica. Los datos se presentan como número de eritrocitos internalizados por cada 100 células (Índice fagocítico). Promedio  $\pm$  desviación estándar de 6 experimentos independientes. **B.** Los monocitos humanos de sangre periférica de distintos donadores se incubaron con las concentraciones indicadas del mAb anti-Fc $\gamma$ RI con (●) o sin (□) fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> del mAb anti-CD13 (10  $\mu$ g) por 30 min. Luego de lavar, se realizó la incubación con los EBS-Abs a 37°C por 30 minutos. Tras la lisis de los eritrocitos no internalizados, se determinó el índice fagocítico por microscopía óptica. Los datos representan el índice fagocítico promedio ( $\pm$  error estándar) de por lo menos 4 donadores diferentes para cada punto. El asterisco (\*) representa una diferencia estadísticamente significativa comparando la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ RI+CD13 con la mediada por el Fc $\gamma$ RI solo.  $p < 0.05$  c=mAb completo. **C.** Los monocitos humanos de sangre periférica de distintos donadores se incubaron con 10  $\mu$ g del mAb anti-CD13, 10  $\mu$ g del mAb anti-Fc $\gamma$ RI o ambos y subsecuentemente con los EBS-Abs de igual forma a la que se mencionó arriba. Cada símbolo representa un donador diferente. **D.** Los monocitos de sangre periférica de distintos donadores se incubaron con distintas concentraciones del mAb anti-CD13 y a continuación con EBS-Abs. Los datos representan el promedio y desviación estándar de por lo menos 4 donadores. La barra sólida representa el índice fagocítico obtenido con 10  $\mu$ g del mAb anti-Fc $\gamma$ RI solo.



**FIGURA 10. La coagregación del Fc $\gamma$ RI con CD13 incrementa la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de monocitos.** Macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica de donadores humanos fueron incubados con las concentraciones indicadas del mAb anti-Fc $\gamma$ RI con o sin fragmentos F(ab) $_2$  del mAb anti-CD13 (10  $\mu$ g) o con el mAb anti-CD13 solo (10  $\mu$ g) durante 30 minutos. Luego de lavar, los macrófagos se incubaron con EBS-Ab a 37°C por 30 minutos. Tras la lisis de los eritrocitos no internalizados, se determinó el índice fagocítico por microscopía óptica. **A.** Los datos representan el promedio del índice fagocítico de macrófagos obtenidos de 3 donadores distintos. **B.** Los datos se presentan como el índice fagocítico relativo que corresponde a la relación entre el índice fagocítico obtenido en presencia de los dos mAbs y el índice obtenido en presencia del anti-Fc $\gamma$ RI solo. Los números que aparecen junto a cada punto corresponden al incremento en la fagocitosis mediada por el FcRI atribuible a la coagregación con CD13.

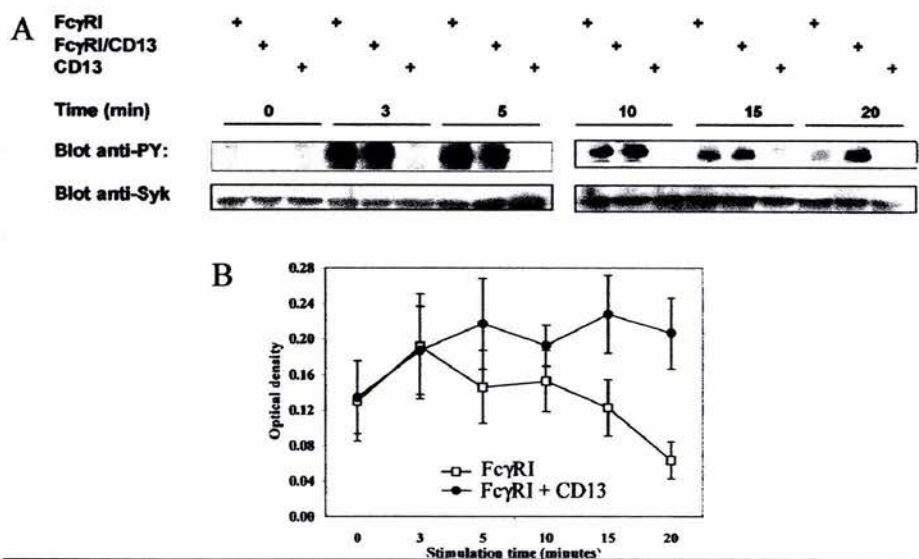
Fc $\gamma$ RI, se observó no solo un incremento en dicho nivel de fosforilación sino su preservación por tiempos más prolongados (hasta 20 minutos).

Bajo las condiciones probadas, la estimulación a través de CD13 solo no indujo fosforilación de Syk a ningún tiempo de incubación aún cuando distintas dosis de anticuerpos primario y secundario fueron probadas (datos no mostrados). La **Figura 11B** muestra los promedios de las densidades ópticas obtenidos al cuantificar la banda correspondiente a Syk en inmunoblots anti-fosfotirosina de 5 experimentos independientes similares al mostrado en la **Figura 11A**.

#### **5.4 CD13 colocaliza parcialmente y co-redistribuye con el Fc $\gamma$ RI**

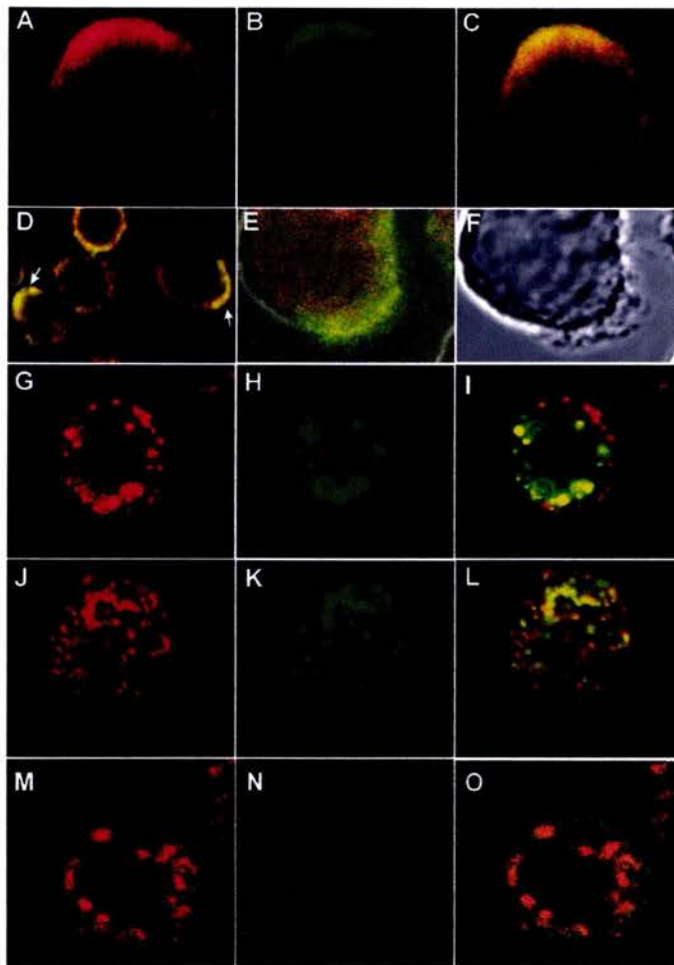
Por microscopía confocal se determinó la posible colocalización entre CD13 y Fc $\gamma$ RI así como la coredistribución tras agregar cada uno de ellos. En células en reposo, prefijadas, usando temperaturas de incubación de 4°C y en presencia de azida de sodio 0.1%, se observó colocalización de CD13 y Fc $\gamma$ RI únicamente en las zonas de la membrana en la que ambas moléculas aparecen polarizadas (~40% de las células, **Figura 12**, imágenes A-D). Estas zonas de polarización coinciden con las zonas de la membrana que presentan lamelipodia y filopodia de manera más prominente (**Figura 12E y F**).

Para los experimentos de coredistribución, se indujo la agregación del Fc $\gamma$ RI a 37°C con el anticuerpo monoclonal primario seguido de un anticuerpo secundario. Luego de fijar las células, la detección de CD13 se realizó a 4°C. Como resultado, parte de la población de CD13 redistribuyó a las zonas de agregación del Fc $\gamma$ RI (**Figura 12**, imágenes G-I). Esta redistribución fue evidente a los 10 minutos y alcanzó su máximo a los 20 minutos de incubación a 37°C, luego de lo cual desapareció observándose a las dos moléculas completamente separadas una de otra (no se muestra).



**FIGURA 11. La coagregación del Fc $\gamma$ RI con CD13 induce una prolongación en el pico de fosforilación de Syk. A:** Células U-937 fueron incubadas con 10  $\mu$ g de mAb anti-Fc $\gamma$ RI, anti-CD13 o ambos. La coagregación se indujo con fragmentos F(ab) $_2$  de anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón durante 3, 5, 10, 15 o 20 minutos a 37°C. Las células fueron lisadas y las proteínas resueltas por SDS-PAGE. Las proteínas fosforiladas se detectaron mediante un inmunoblot anti-fosfotirosina (Blot anti-PY). Las bandas en el panel superior muestran la proteína fosforilada en el peso molecular de Syk (72 kDa). Para corroborar la identidad de esta banda, la misma membrana fue eluida y re-probada con un anticuerpo policlonal anti-Syk (Blot anti-Syk). **B:** Promedio  $\pm$  SD de 5 experimentos individuales iguales al mostrado en A. Cada punto representa el promedio de la densidad óptica de la banda de Syk en el blot anti-PY.





**FIGURA 12. Colocalización y coreistribución de CD13 con Fc $\gamma$ RI. A-D:** Células U-937 fueron prefijadas con PFA. El Fc $\gamma$ RI se detectó con un mAb primario anti-Fc $\gamma$ RI seguido de fragmentos F(ab) $'_2$  de un anticuerpo secundario conjugado con FITC B: El CD13 se detectó a continuación mediante incubación con fragmentos F(ab) $'_2$  de un mAb anti-CD13 biotinilado y luego con estreptavidina marcada con TR a 4°C (A). La imagen compuesta (C) muestra la colocalización de Fc $\gamma$ RI y CD13 (amarillo) en una célula polarizada. La imagen D muestra un campo en el cual el CD13 y el Fc $\gamma$ RI están polarizados en varias células (flechas) E-F: Las zonas de colocalización corresponden a zonas de la membrana que presentan lamelipodia y filopodia. G-I: Las células se incubaron con el mAb anti-Fc $\gamma$ RI seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC por 20 minutos a 4°C. A continuación se incubaron a 37°C por 20 minutos para permitir la agregación. Enseguida se fijaron y se realizó la detección de CD13 con fragmentos F(ab) $'_2$  del mAb anti-CD13 conjugado con TR a 4°C y en presencia de azida de sodio. I corresponde a la imagen compuesta que muestra las zonas de coreistribución de Fc $\gamma$ RI y CD13 como agregados amarillos. J-L: Las células fueron incubadas con fragmentos F(ab) $'_2$  del mAb anti-CD13 conjugados con TR por 20 minutos a 4°C y enseguida con un anticuerpo secundario no marcado para permitir la agregación a 37°C por 20 minutos más. Luego de fijar las células, se detectó el Fc $\gamma$ RI con un mAb anti-Fc $\gamma$ RI marcado con FITC a 4°C y en presencia de azida de sodio. L corresponde a la imagen compuesta que muestra la coreistribución de Fc $\gamma$ RI y CD13. M-O: Las células se incubaron con el mAb anti-Fc $\gamma$ RI seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Ficoeritrina durante 20 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron a 37°C por 20 minutos para permitir la agregación y luego de fijar, se detectó CD33 con un mAb específico marcado con FITC a 4°C bajo las mismas condiciones de la tinción para CD13 usadas en las imágenes G-I.

Al llevar a cabo el experimento opuesto, se observó una redistribución total del Fc $\gamma$ RI hacia las zonas de agregación de CD13 (**Figura 12J-L**). Como control, la agregación del Fc $\gamma$ RI, no indujo redistribución de otras moléculas como CD33 (**Figura 12, imágenes M-O**).

## 6. CONCLUSIONES (PRIMERA PARTE)

En los últimos años, se ha hecho cada vez más claro que las interacciones entre moléculas de membrana modulan los fenómenos de señalización celular y por tanto, las respuestas efectoras. Sin embargo, la posibilidad de que la señalización inducida por Fc $\gamma$ Rs fuera regulada de la misma manera como lo es aquella inducida por otros receptores de reconocimiento inmune, no había sido usualmente considerada. Así, la visión generalizada es que las respuestas mediadas por Fc $\gamma$ Rs, se modulan principalmente por el balance entre las isoformas activadoras e inhibidoras de Fc $\gamma$ Rs tras la interacción de la célula con una partícula opsonizada con IgG o con un complejo antígeno-anticuerpo.

A pesar de ello, una posible cooperación funcional entre CD13 y Fc $\gamma$ Rs ya había sido sugerida (McIntyre *et al.*, 1989) y los resultados presentados en el presente trabajo otorgan mayor solidez a tales suposiciones.

La primera evidencia que sugiere una interacción funcional entre CD13 y Fc $\gamma$ Rs es el hecho de que CD13 redistribuya a las zonas de contacto entre eritrocitos opsonizados con IgG y monocitos. Como se discutió previamente, la fagocitosis es un proceso altamente selectivo y por tanto la redistribución activa de una molécula a la zona de fagocitosis se considera un indicador claro de que dicha molécula tiene un rol directo en el proceso de fagocitosis. Además, se demostró que éste fenómeno de redistribución es un proceso activo que no ocurre a 4°C por lo que no es consecuencia únicamente de la unión del blanco fagocítico al monocito sino que requiere seguramente de un proceso de transducción de señales generadas por Fc $\gamma$ Rs.

Es interesante el hecho de que una gran parte de moléculas de CD13 son internalizadas hacia los fagosomas. Dado que cierta señal fluorescente correspondiente al CD13 internalizado, aparece también en el citoplasma después de la fagocitosis, es posible que un fenómeno de internalización (endocitosis) de CD13 ocurra simultáneamente al proceso fagocítico. Ya ha sido reportada la internalización de CD13 tras la ocupación del sitio activo de la enzima por anticuerpos monoclonales (Lohn *et al.*, 2002). Sin embargo, otra posible explicación pudiera ser un proceso de retrotranslocación de CD13 hacia la membrana fagosomal externa (como puede concluirse por la distribución de CD13 en la Figura 8A) y de allí al citosol (Figura 7M y 8C). Fenómenos de ésta naturaleza han sido reportados por varios autores como Houde *et al.*, 2003, quienes demostraron precisamente retrotranslocación del contenido fagosomal a la membrana fagosomal externa y de ahí al citosol tras 60 minutos de incubación de macrófagos con esferas de látex cubiertas con ovoalbúmina.

Demostramos también que partículas fagocitables (EBS-Abs) que se unen al fagocito a través del Fc $\gamma$ RI y del CD13 simultáneamente, son internalizados más eficientemente que las mismas partículas cuando se unen al fagocito a través del Fc $\gamma$ RI solamente. El mismo fenómeno ocurrió tanto con células de la línea U-937 como con monocitos primarios aislados de sangre periférica y macrófagos derivados de éstos monocitos.

Un hallazgo inesperado fue la inducción de fagocitosis por EBS-Abs que se unen a la célula a través del CD13 solamente, lo cual también ocurrió en los tres tipos celulares probados (U-937, monocitos primarios y macrófagos derivados de monocitos). Así, células pre-incubadas con anticuerpo anti-CD13 (completo o en fragmentos F(ab) $'_2$ ), fueron capaces de internalizar EBS-Abs con una eficiencia similar a la observada a través del Fc $\gamma$ RI solo. Como controles, células pre-incubadas sin ningún anticuerpo, células pre-incubadas con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (anti-DNP), y células pre-incubadas con un anticuerpo contra otra molécula altamente expresada en monocitos, CD33, fueron incapaces

de internalizar EBS-Abs. Además el fenómeno de internalización mediado por CD13 es dependiente de la dosis, de tal manera que dosis crecientes del anticuerpo anti-CD13 se relacionan con un incremento paralelo en la fagocitosis de EBS-Abs. Éste resultado sugiere que se trata de una fagocitosis específicamente mediada por CD13.

En conclusión, CD13 no sólo es capaz de modular positivamente la fagocitosis mediada por el Fc $\gamma$ RI, sino que bajo ciertas circunstancias, es capaz de mediar fagocitosis en un nivel similar al mediado por el Fc $\gamma$ RI. Esto podría sugerir que el incremento en el índice fagocítico que se observa cuando las dos moléculas son coagregadas es la consecuencia de la suma de las dos fagocitosis individuales. Sin embargo, no se pudo determinar con certeza si el efecto es aditivo o sinérgico. Un resultado que sugiere que no se trata de un efecto aditivo es que la magnitud del incremento (cuando ambas moléculas se co-agregan) no es directamente proporcional al índice fagocítico obtenido con el CD13 sólo. Sin embargo, para considerar un efecto sinérgico, se esperaría que a una dosis dada, la fagocitosis obtenida al coagregar al CD13 con el Fc $\gamma$ RI sea significativamente mayor que la suma de las fagocitosis mediadas por cada uno de ellos por separado, lo cual nunca se observó. A pesar de que no se pueda determinar si se trata de un efecto sinérgico o aditivo, el hallazgo de que CD13 es capaz de modular la fagocitosis mediada por el Fc $\gamma$ RI es importante independientemente del origen del fenómeno.

El significado biológico de la fagocitosis mediada por CD13 es difícil de establecer en este punto. En los experimentos de dosis respuesta se puede observar que una fagocitosis óptima a través de CD13 ocurre sólo a concentraciones del anticuerpo cercanas a las requeridas para la saturación, lo que indica que una fracción importante de las moléculas de CD13 expresadas en la membrana debe ser ocupada para que proceda la fagocitosis. Es incierto si niveles tan altos de ocupación pueden o no ocurrir *in vivo* y, por lo tanto, la participación de CD13 en la fagocitosis pudiera ser más relevante cuando CD13 no es el

único receptor implicado, sobre todo cuando el nivel de opsonización del blanco fagocítico es subóptima.

Otro resultado importante que sugiere que CD13 regula la señalización inducida por el FcγRI es el incremento en el nivel y duración del estado de fosforilación de la cinasa Syk que se observó tras la coagregación inducida por anticuerpos en suspensión del FcγRI con CD13 en comparación con el nivel de fosforilación obtenido al agregar al FcγRI sólo. Este efecto muestra claramente como la coagregación de CD13 resulta en una modificación de las señales bioquímicas desencadenadas por la agregación del FcγRI. Dado que la cinasa Syk, como se mencionó en los antecedentes, tiene un papel indispensable en el proceso de fagocitosis mediada por FcγRs (Crowley, 1997), es tentador proponer que éste efecto de prolongación de su estado de activación podría estar relacionado con el incremento en la fagocitosis observado cuando es la partícula fagocitable quien induce la coagregación de las dos moléculas.

También es interesante la observación de que la agregación de CD13 solo no induce ningún cambio en los niveles de fosforilación de Syk, lo que sugiere que dicha agregación solamente afecta el estado de fosforilación de Syk cuando coexiste la estimulación a través del FcγRI.

Por otro lado, dado que CD13 es capaz de mediar fagocitosis, las vías de señalización relacionadas con ése fenómeno parecen ser independientes de Syk. Este resultado concuerda con lo reportado por Navarrete-Santos *et al.*, 2000a quienes mostraron que inhibidores de cinasas de tirosina no inhiben el pico inicial de liberación de Ca<sup>2+</sup> que se induce con anticuerpos anti-CD13 en células U-937.

Finalmente, se demostró que mientras en una población de células U-937, el FcγRI y el CD13 aparecen distribuidos independientemente uno del otro, en aquellas células en las que CD13 está polarizado en una zona de la membrana, el FcγRI colocaliza con él. Además, cuando se induce la agregación del FcγRI con un anticuerpo primario a 4°C seguido por un

secundario a 37°C, una parte del total de moléculas de CD13 redistribuye a la zona de agregación. En cambio, cuando se induce la agregación de CD13 por el mismo método, lo que se observa es una redistribución casi completa del FcγRI, tanto en células U-937 como en monocitos humanos aislados de sangre periférica. Como control, la agregación del FcγRI no indujo redistribución de la molécula CD33 sugiriendo que el fenómeno de redistribución es específico.

En conjunto, los resultados demuestran que la agregación de FcγRs (ya sea inducida por eritrocitos opsonizados con IgG o por anticuerpos secundarios individualmente), induce una coredistribución de CD13. Éste fenómeno podría tener una verdadera relevancia funcional ya que bajo condiciones en las cuales ambas moléculas son intencionalmente coagregadas (fagocitosis de EBS-Abs y coagregación con anticuerpos secundarios para las determinaciones de fosforilación de Syk), se observa una modulación positiva de la señalización.

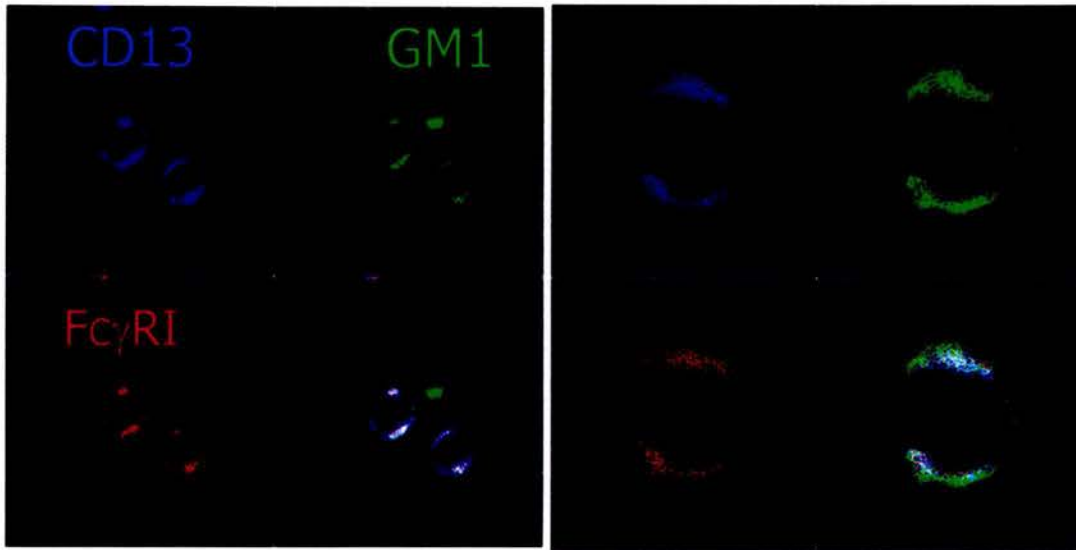
El significado funcional de la interacción entre CD13 y FcγRI *in vivo* tendrá que ser establecido en el futuro. Una interesante posibilidad es que el CD13 establezca interacciones con moléculas derivadas de patógenos de tal manera que cuando ambos, el CD13 y el FcγRI se unan a sus ligandos (por ejemplo en un microorganismo opsonizado con IgG que además contenga un ligando de CD13), una regulación positiva de la señal mediada por el FcγRI ocurra. Aunque un ligando natural para CD13 en la superficie de un patógeno fagocitable no ha sido descrito, su papel como receptor viral está bien descrito y en el insecto *Manduca sexta* así como en otras especies de insectos, el CD13 es receptor de la toxina CryA(c) del *Bacillus thuringiensis* (Knight *et al.*, 2004).

Además, la Galectina-4 ha sido reportada como un ligando de CD13 en el epitelio del borde en cepillo del intestino delgado y debido al rol de las galectinas como opsoninas, una posibilidad interesante sería que éstas moléculas participaran como ligandos de CD13 durante

la fagocitosis. (Danielsen y Deurs, 1997 y Mandrell *et al.*, 1994). Finalmente, varios autores consideran a los substratos e inhibidores de CD13 como ligandos, desde el punto de vista de que pudieran desencadenar señales mediadas por CD13 lo cual, dado el gran número de substratos descritos, sería de gran relevancia *in vivo*.

Por otro lado, aunque la participación de CD13 en el procesamiento de antígenos, fenómeno que era bien aceptado, ha entrado en controversia, nuestros resultados pudieran sugerir un papel del CD13 que es internalizado hacia el fagosoma en el procesamiento de antígenos tras la fagocitosis. Recientemente, apoyando nuestros resultados, por técnicas de aislamiento de fagosomas, se ha detectado la presencia de CD13 en balsas de lípidos de la membrana fagosomal (Li *et al.*, 2003).

En cuanto a las balsas de lípidos, se ha reportado que una gran parte de la población de CD13 de monocitos está asociada a dichas estructuras (Navarrete-Santos *et al.*, 2000c). Los FcγRs así como otros MIRRs como el BCR, el TCR y el FcεRI, se encuentran excluidos de las balsas de lípidos pero translocan hacia ellas tras su agregación (Kono *et al.*, 2002; Kwiatkowska *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 1999; Langlet *et al.*, 2000; Montixi *et al.*, 1998). Además, como se mencionó en los antecedentes, hay indicaciones de que los coreceptores o moléculas de coestimulación influyen en la permanencia de los MIRRs en las balsas de lípidos (Cherukuri *et al.*, 2001). Nuestros resultados preliminares muestran colocalización entre el FcγRI, CD13 y el gangliósido M1 en las zonas de polarización (**Figura 13**). Por lo tanto, se podría sugerir que uno de los mecanismos por los que CD13 regula la señalización inducida por el FcγRI es modificando la afinidad de éste receptor por las balsas de lípidos, consecuentemente aumentando su permanencia dentro de ellas. Esto podría explicar la



**FIGURA 13.** Las zonas en las que colocalizan el  $Fc\gamma RI$  y  $CD13$  corresponden a zonas marcadas por toxina  $\beta$  del cólera. Células U-937 fueron incubadas a  $4^{\circ}C$  con solución de bloqueo (PBS/SFB 5%) y a continuación con los anticuerpos primarios anti- $Fc\gamma RI$  o anti- $CD13$  biotinilado durante 30 minutos en presencia de azida de sodio al 1% en la misma solución de bloqueo. Luego de varios lavados, se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con Ficoeritrina para la detección del  $Fc\gamma RI$  o estreptavidina conjugada con el fluorocromo Alexa 405 para el  $CD13$ . Tras nuevos lavados, se añadió la toxina  $\beta$  del cólera directamente marcada con FITC durante 30 minutos más. Las células fueron lavadas y montadas para su análisis por microscopía confocal como se describe en **Materiales y Métodos**. Como se observa en el panel de la izquierda (magnificación 20X) y en de la derecha (otra célula capturada a una magnificación de 40X), las zonas de colocalización entre el  $Fc\gamma RI$  y  $CD13$  coinciden parcialmente (color blanco) con aquellas zonas de la membrana marcadas por la toxina del cólera (gangliósido M1) que corresponden a balsas de lípidos. Si bien a esta resolución es imposible determinar el significado estructural de ésta colocalización, estos datos sugieren la participación de las balsas de lípidos en los fenómenos que involucran asociación funcional de  $CD13$  y  $Fc\gamma RI$ .



prolongación observada en el nivel de fosforilación de Syk ya que las cinasas de la familia Src que son las responsables de la fosforilación inicial de las tirosinas del ITAM, se encuentran predominantemente en balsas de lípidos y se ha reportado que la propia Syk transloca a éstos dominios de membrana tras la agregación del FcεRI (Field, 1997). Aún más, la parte de la población total de CD13 que colocaliza con el FcγRI durante la fagocitosis podría corresponder a aquella asociada con las balsas de lípidos, teniendo en cuenta el papel crucial que ha sido demostrado para éstas estructuras en la fagocitosis (Dermine *et al.*, 2001 y Li *et al.*, 2003).

## 7. RESULTADOS (SEGUNDA PARTE).

Una vez que el posible rol de CD13 como molécula de coestimulación de FcγRs fue establecido, se propuso la posibilidad de que el mecanismo detrás de este efecto consistiera en un fenómeno de incremento de adhesión que permitiera la estabilización de los contactos célula-partícula fagocítica, prolongando así el estado de activación celular, como ocurre en el caso de las moléculas de coestimulación LFA-1/ICAM-1 como ya se describió.

Un posible papel de CD13 en adhesión celular ya había sido sugerido por Menrad *et al.*, quienes observaron que tras una localización uniforme de CD13 en la membrana de células de un melanoma maligno, la molécula redistribuía a las zonas de contacto célula-célula y/o a las zonas de contacto célula-substrato durante la adhesión. Además, observaron que los filopodia de estas células presentaban intensa señal al marcar CD13 con el anticuerpo monoclonal 452. Sin embargo, en células de linaje monocítico, que son las que mayores niveles de expresión de CD13 presentan en el humano, el papel de CD13 en interacciones célula-célula no había sido explorado.

Interesantemente, durante el desarrollo del proyecto de investigación, observamos que el anticuerpo monoclonal 452 era capaz de inducir agregación homotípica en la línea celular U-937. La agregación homotípica (AH) es un fenómeno de gran importancia tanto en condiciones fisiológicas como en la patogénesis de varias enfermedades. Así, es crucial durante la embriogénesis, angiogénesis y durante la respuesta inmune pero también participa en la fisiopatología de enfermedades como el cáncer por su rol en los fenómenos de neoangiogénesis, invasividad y metástasis tumorales (Bischoff, 1997) y curiosamente, CD13 ha sido implicado en todos ellos (Baghwat *et al.*, 2001 y 2003; Bauvois, 2004; Kido *et al.*, 2003; Saiki *et al.*, 1993). Cabe mencionar que ya ha sido demostrado *in vivo* que durante el proceso de metástasis tumoral, las células forman agregados homotípicos en las zonas de los vasos en las cuales iniciarán la extravasación (Glinsky *et al.*, 2003).

Varias moléculas capaces de mediar agregación homotípica han sido descritas, entre ellas, CD98 (Cho *et al.*, 2001) CD43 (Cho *et al.*, 2003), CD147 (Kasinrerker *et al.*, 1999 y Cho *et al.*, 2001) y CD29. En todos los casos, el modelo celular utilizado para la caracterización del fenómeno de agregación ha sido el de la línea celular U-937. Por tanto, consideramos que el hecho de que el anticuerpo monoclonal 452 mediara agregación homotípica de ésta línea celular, constituía una herramienta ideal para caracterizar el papel de CD13 en la estabilización de contactos célula-célula y procedimos a su caracterización.

### **7.1 El anticuerpo monoclonal anti-CD13 452, induce agregación homotípica en la línea celular U-937 de una manera dosis y tiempo-dependientes**

Para la evaluación inicial de CD13 en la adhesión de células monocíticas, se usó la línea celular U-937 como modelo ya que ha sido utilizada ampliamente en AH. La incubación de  $5 \times 10^4$  células U-937 con el anticuerpo anti-CD13 ya sea completo o fragmentado (F(ab)'2),

indujo agregación homotípica de manera dependiente de la dosis y el tiempo (**Figura 14A**). Sin embargo, dado que previamente describimos una cooperación funcional entre FcγR y CD13, usamos fragmentos F(ab)<sup>2</sup> del anticuerpo durante toda la experimentación. El fenómeno de agregación fue cuantificado inicialmente por microscopía óptica con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de agregación} = \frac{\text{número de células agregadas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

El porcentaje de células en agregados llegó a una meseta a concentraciones de anticuerpo de entre 0.09 y 3 μg/ml (**Figura 14A**), disminuyendo considerablemente a concentraciones superiores o inferiores a éstas. Los agregados fueron más pequeños a las concentraciones mínimas necesarias para inducir el máximo porcentaje de agregación (0.09 μg/ml, **Figura 14A**, flecha vacía). Por tanto, se escogió para el resto de la experimentación, la dosis mínima necesaria para obtener agregados de tamaño máximo (0.39 μg/ml, **Figura 14A**, flecha sólida). A la observación microscópica, la agregación empezó a ser evidente aproximadamente a los 15 minutos de incubación a 37°C y aproximadamente el 80% de las células ya se encontraban agregadas a las 4 a 5 horas de incubación [**Figura 14B**, los valores incluyen los agregados más pequeños (pares de células)]. Períodos de incubación mayores a 4 horas generaban agregados celulares tan grandes que eran imposibles de cuantificar por microscopía óptica. Por lo tanto, un método computarizado de cuantificación fue utilizado como se describe en materiales y métodos y los datos se presentan como Índices de agregación (I.A.):

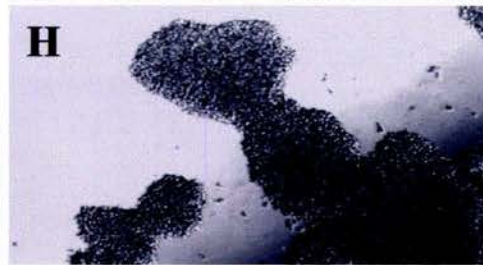
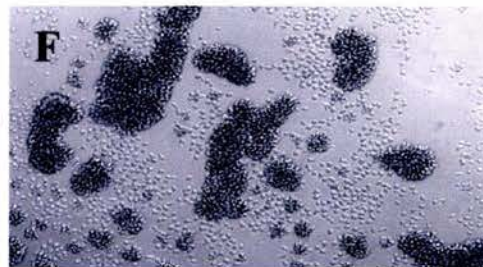
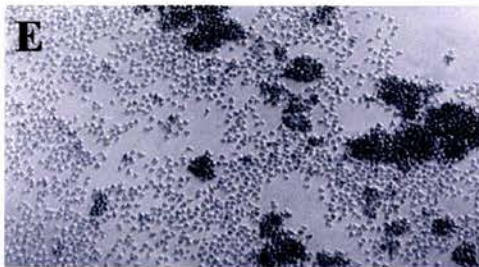
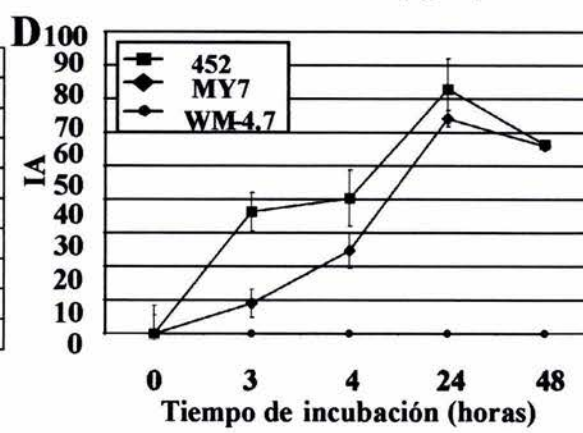
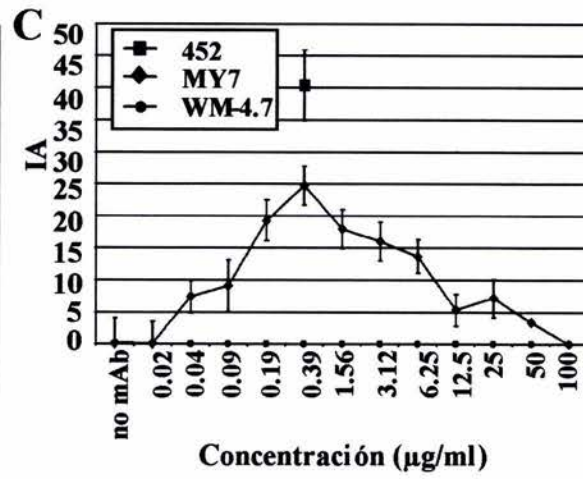
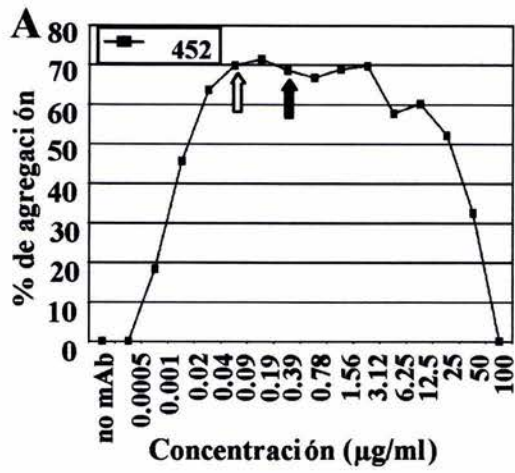
$$\text{Índice de agregación} = \frac{\text{\# de colonias azules (células agregadas)}}{\text{\# total de células (colonias azules y amarillas)}} \times 100$$

El programa detecta los agregados como colonias azules por su mayor densidad óptica y las células no agregadas como colonias amarillas (por su menor densidad óptica). Como se muestra en la **Figura 14D**, el pico de agregación se observó a las 24 horas de incubación con el anticuerpo 452 y las células empezaron a desagregarse a las 48 horas. Es importante mencionar que a mayor concentración celular, mayor la velocidad a la que ocurre el fenómeno de agregación. Así, a concentraciones de  $2 \times 10^6$  cells/ml, más del 90% de las células se encuentran agregadas tras 1 hora de incubación a 37°C (dato no mostrado).

## **7.2 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 para inducir agregación homotípica no correlaciona con su capacidad para inhibir la actividad enzimática de CD13**

Un nuevo anticuerpo anti-CD13 (clona WM-4.7), fue probado en cuanto a su capacidad para inducir AH. Interesantemente, no indujo AH a ninguna de las concentraciones ni tiempos de incubación probados (**Figuras 14C-D**). Como se sabe que éste anticuerpo no bloquea la actividad enzimática de CD13 (Ashmun *et al.*, 1992) y, en cambio, el efecto del anticuerpo inductor de AH 452 se desconoce, surgió la posibilidad de que la AH estuviera relacionada con un efecto diferencial de ambos anticuerpos sobre la actividad enzimática de CD13. Por lo tanto, para estudiar esa hipótesis, se probaron otros dos anticuerpos monoclonales anti-CD13: el MY7 que se sabe que bloquea parcialmente la actividad enzimática de CD13 y el WM-15, que es uno de los mejores inhibidores de dicha actividad (Ashmun *et al.*, 1990 y 1992).

El anticuerpo MY7 indujo AH en las células U-937. Esta AH fue similar a la obtenida con el anticuerpo 452 (**Figuras 14C-D**). Así, altas dosis del anticuerpo MY7 fueron pobres inductoras de AH y la dosis óptima fue exactamente la misma que para el anticuerpo 452 (0.39 µg/ml, **Figura 14C**). El máximo I.A. obtenido con el MY7 fue menor que el observado

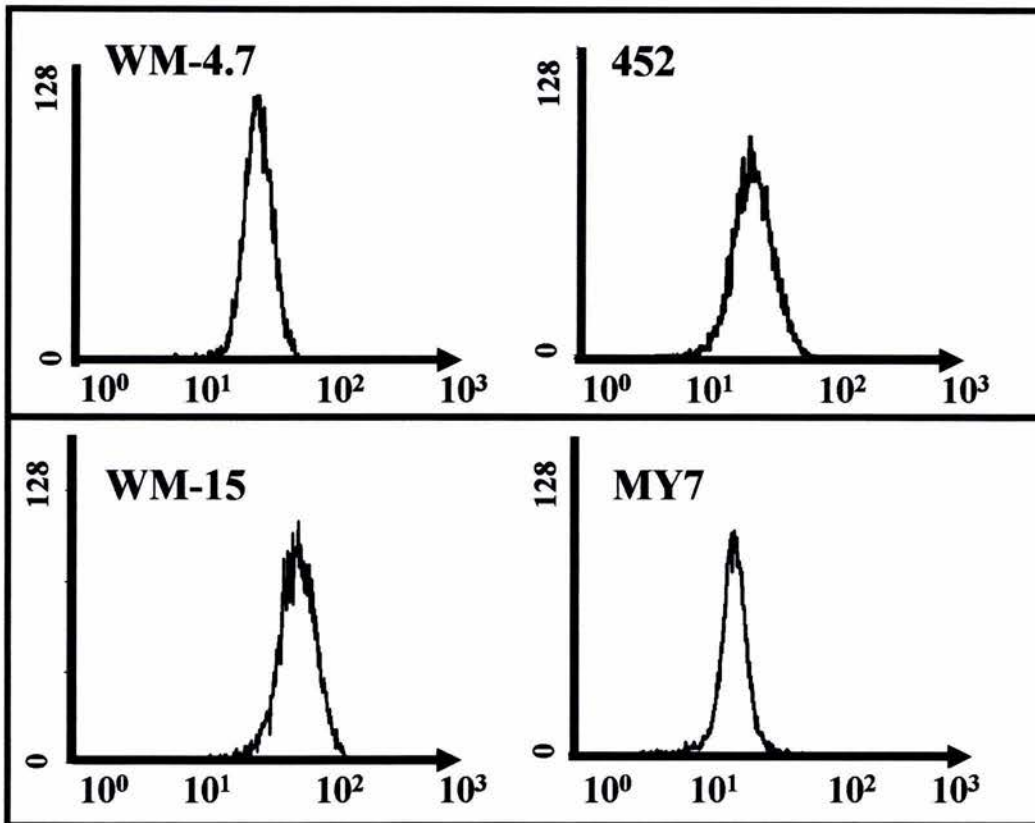


**FIGURA 14. Dependencia de dosis y curso temporal de la AH inducida por mAbs anti-CD13.** **A.** Células U-937 fueron incubadas por 4 horas a 37°C con las concentraciones indicadas del mAb anti-CD13 452 en placas de 96 pozos. El porcentaje de agregación fue determinado por microscopía óptica como el número de células agregadas/número total de células x 100. Los agregados obtenidos con la mínima dosis necesaria para inducir agregación (0.09 µg/ml, flecha vacía), eran pequeños. La mínima dosis necesaria para inducir agregados del tamaño máximo fue de 0.39 µg/ml (flecha sólida). **B.** Curso temporal, determinado por microscopía óptica, de la AH inducida por el mAb anti-CD13 452 a la dosis óptima (■). Como control, las células fueron incubadas bajo las mismas condiciones con un mAb del mismo isotipo (●). **C.** AH inducida por diferentes mAbs anti-CD13. Las células fueron incubadas con el mAb indicado por 4 horas a 37°C. Se obtuvieron imágenes de cada muestra usando una cámara adaptada al microscopio invertido. A continuación, usando la función de conteo de colonias del programa Quantity One de Bio-Rad, se determinó el Índice de agregación [IA, número de células detectadas por el programa como colonias azules en cada imagen (células agregadas)/número total de células detectadas x 100]. Se observó que la dosis óptima del mAb MY7 (◆) es idéntica a la del 452 (■). El mAb WM-4.7 (●) no indujo AH a ninguna de las dosis probadas. **D.** Curso temporal de la AH inducida por los anticuerpos indicados a 37°C. El mAb WM4.7 no indujo AH a ningún tiempo de incubación. **E-F.** Imágenes representativas de la AH obtenida a las 4 horas de incubación con los mAbs MY7 y 452 respectivamente. **G-H.** AH obtenida con los mAbs MY7 y 452 mAb respectivamente a las 24 horas de incubación a 37°C.

con la dosis óptima del 452 a las 4 horas de incubación (**Figuras 14C, E-F**). Sin embargo, a las 24 horas de incubación, la AH obtenida con la dosis óptima del anticuerpo MY7 había llegado a niveles similares que los obtenidos con el 452 (**Figuras 14D, G-H**). El anticuerpo WM-15, también fue capaz de inducir AH aunque menor a la obtenida con los anticuerpos 452 y MY7 (no mostrado).

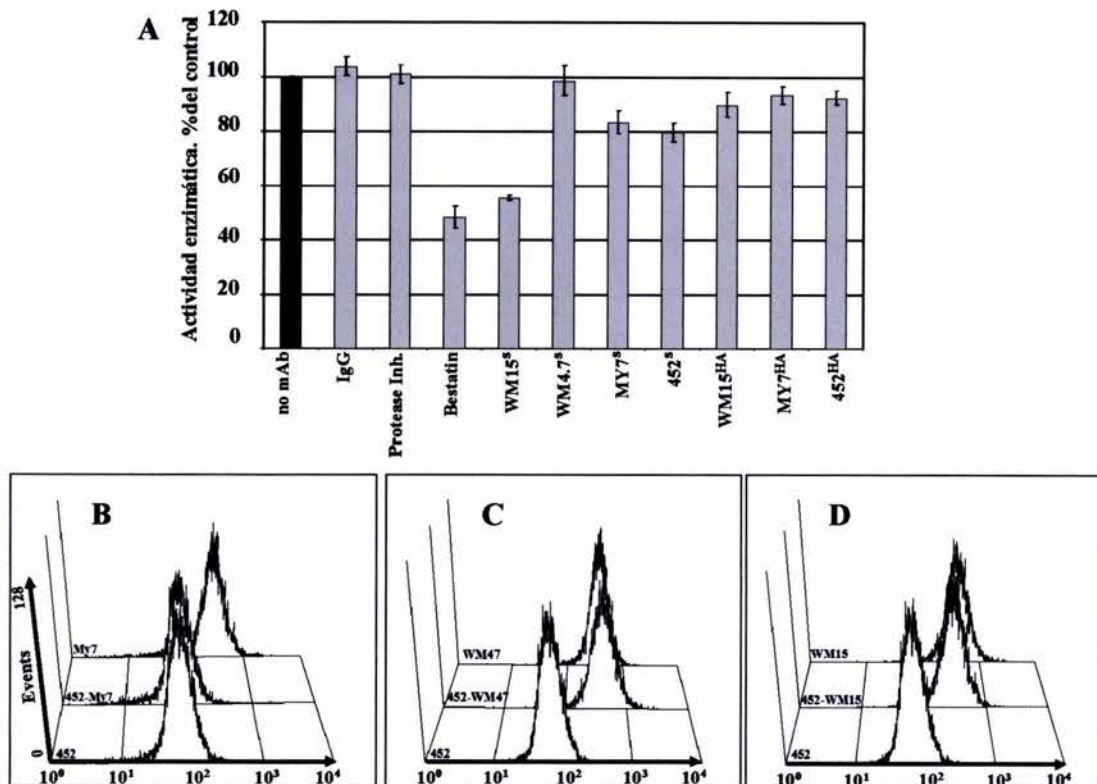
Para descartar la posibilidad de que las diferencias en la habilidad de los cuatro anticuerpos para inducir AH, no dependiera de su capacidad de unirse a las células, la medimos por Citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 15**, los cuatro anticuerpos fueron igualmente capaces de unirse a las células U-937 excluyendo esa posibilidad.

A continuación, con el fin de correlacionar mejor los resultados de AH con la actividad enzimática de CD13, medimos la actividad de aminopeptidasa de membrana en presencia de los distintos anticuerpos (**Figura 16A**). Como control se usó Bestatina, un inhibidor de aminopeptidasas con gran especificidad por el CD13 de membrana. Dado que la inducción óptima de AH ocurre a concentraciones subsaturantes de los anticuerpos, se determinó la actividad enzimática tanto a dosis saturantes como a las dosis óptimas para inducir AH. Tal como había sido reportado previamente en células mieloides (Ashmun *et al.*, 1990), a concentraciones saturantes, el anticuerpo monoclonal WM-4.7 no tuvo efecto en la actividad enzimática mediada por CD13 (**Figura 16A**, WM-4.7<sup>s</sup>), los anticuerpos MY7 y 452 (MY7<sup>s</sup>, 452<sup>s</sup>) tuvieron un pequeño pero estadísticamente significativo efecto sobre la actividad enzimática, mientras que Bestatina y el anticuerpo WM-15 (WM-15<sup>s</sup>) inhibieron la actividad enzimática en aproximadamente un 50%. Cabe señalar que la actividad enzimática residual proviene de otras aminopeptidasas de membrana según ha sido reportado anteriormente (Ashmun *et al.*, 1990). Por el contrario, a dosis óptimas para la inducción de AH (452<sup>HA</sup>, MY7<sup>HA</sup> y WM-15<sup>HA</sup>, **Figura 16A**), ninguno de los anticuerpos capaces de inducir agregación fue capaz de inhibir la actividad enzimática. Además, el bloqueo químico



**FIGURA 15.** La capacidad de los distintos anticuerpos anti-CD13 para inducir AH **no depende de diferencias en su capacidad de unión a las células.** La unión de los mAbs anti-CD13 indicados ( $2.5 \mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$ ) a sus correspondientes epítomos en las células U-937 fue determinada mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo. Se muestra un histograma de un experimento representativo con el anticuerpo indicado.





**FIGURA 16.** La capacidad de los distintos mAbs anti-CD13 para inducir AH no correlaciona con su habilidad para inhibir la actividad enzimática de CD13 sino con su especificidad de unión. **A.** Las células ( $5 \times 10^5$ ) fueron incubadas con los anticuerpos o inhibidores indicados por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación se añadió el sustrato (H-Ala-pNA) a una concentración final de  $6\text{mM}$  y se incubó con las células por una hora más, a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente las células fueron centrifugadas y se determinó la densidad óptica (D.O.) a  $405\text{nm}$  en los sobrenadantes. Se muestran los porcentajes de la D.O. normalizada contra el control de células incubadas sin ningún anticuerpo o inhibidor previo a la adición del sustrato (no mAb). El inhibidor bestatina se usó a una concentración de  $0.4\ \mu\text{g/ml}$ . s=concentración saturante y HA=dosis óptima para inducir agregación homotípica de los anticuerpos indicados. **B.** El histograma frontal corresponde a células incubadas a  $4^\circ\text{C}$  con el mAb inductor de agregación 452 por 30 minutos. Luego de lavar, se añadió un anticuerpo secundario conjugado con FITC por 30 minutos más. Las células se fijaron y analizaron por citometría de flujo. El histograma medial se obtuvo a partir de células incubadas los primeros 30 minutos con el mAb 452, y luego con el mAb MY7 por otros 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario y se fijó igual igual que en B. El histograma posterior corresponde a células incubadas por 30 minutos con el mAb MY7 solamente. La fluorescencia más alta obtenida con el mAb MY7 fue inhibida por la preincubación con el mAb 452. **C.** Igual protocolo que en B pero usando el mAb incapaz de inducir agregación (WM-4.7). En este caso, el pico de fluorescencia obtenido con el WM-4.7 solo, no se inhibió por preincubación con el mAb 452. **D.** Igual protocolo que en B pero usando el mAb WM-15 mAb. Otra vez, el mAb 452 no bloqueó la unión de éste anticuerpo.

de la actividad enzimática con dosis inhibitoras de Bestatina no indujo AH ni afectó aquella inducida por el anticuerpo 452 (no mostrado). Adicionalmente, como se muestra más adelante, el EDTA, que es un inhibidor irreversible de la actividad APN, tampoco tuvo efecto en la AH mediada por CD13. En conjunto, estos resultados indican que la AH inducida por anticuerpos anti-CD13 es independiente de su actividad enzimática.

### **7.3 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD13 para inducir agregación homotípica correlaciona con su especificidad de unión a epítomos específicos**

Ya que la actividad enzimática de CD13 parecía no estar relacionada, se probó la posible relación entre el epítomo reconocido por cada uno de los anticuerpos y su habilidad para inducir AH. Los sitios de unión de dos de los tres anticuerpos capaces de inducir AH ya se conocían: el WM-15 se une al dominio de unión a zinc de la enzima mientras que el MY7 se une a un epítomo distinto pero muy cercano a dicho dominio (Yeager *et al.*, 1992 y Ashmun *et al.*, 1992). El epítomo reconocido por el tercer anticuerpo inductor de AH, el 452, no se conocía. Por otro lado, el anticuerpo WM-4.7, que es incapaz de inducir AH, se sabe que se une a un sitio distinto del dominio de unión al zinc (Ashmun *et al.*, 1992). Con estos datos en mente, se realizaron ensayos de competencia por citometría de flujo. La pre-incubación de las células U-937 con el anticuerpo 452, bloqueó la unión del anticuerpo MY7 sugiriendo que ambos anticuerpos se unen al mismo epítomo o al menos que se trata de epítomos muy cercanos entre sí (**Figura 16B**). En cambio, la pre-incubación con el anticuerpo 452 no bloqueó la unión del anticuerpo WM-4.7 (**Figura 16C**). La unión del WM-15, que ha sido mapeada en el dominio de unión al Zinc de CD13, no fue bloqueada ni por el anticuerpo 452 (**Figura 16D**) ni por el MY7 (no mostrado). Por tanto, ya que se sabe que los epítomos reconocidos por el WM-15 y el MY7 (y consecuentemente el 452) se localizan muy cerca

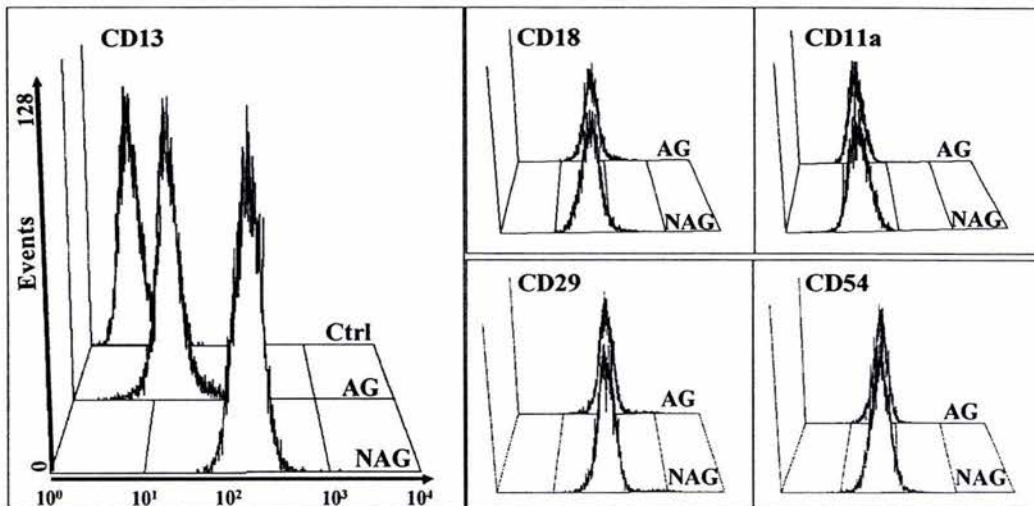
(Ashmun *et al.*, 1992), estos resultados sugieren que la capacidad de los tres anticuerpos para inducir AH depende de su unión a un sitio específico en la molécula CD13, el cual se encuentra cerca al sitio activo enzimático.

#### **7.4 La expresión en membrana de CD13 pero no la de moléculas de adhesión disminuye durante la agregación homotípica**

Para determinar el efecto de la AH en la expresión de CD13 y moléculas de adhesión en la membrana, se probó por citometría de flujo la expresión de las moléculas indicadas a las 4 y 24 horas de incubación en células agregadas y no agregadas. Como se observa en la **Figura 17**, en la que los histogramas delanteros representan la expresión de la molécula indicada en células no agregadas (NA) y los histogramas posteriores representan su expresión en células agregadas (A); una clara y sostenida disminución en la expresión de CD13 se observó mientras que no hubo cambio en la expresión de ninguna de las otras moléculas. Lo mismo se observó a los dos tiempos de incubación. Estos resultados sugieren tanto que la disminución en la expresión de CD13 es específica, como que la AH no depende de un incremento en los niveles de expresión de las integrinas probadas.

#### **7.5 Efecto de anticuerpos monoclonales anti-CD29, CD11a, CD18, CD54 y CD98 en la agregación homotípica mediada por CD13**

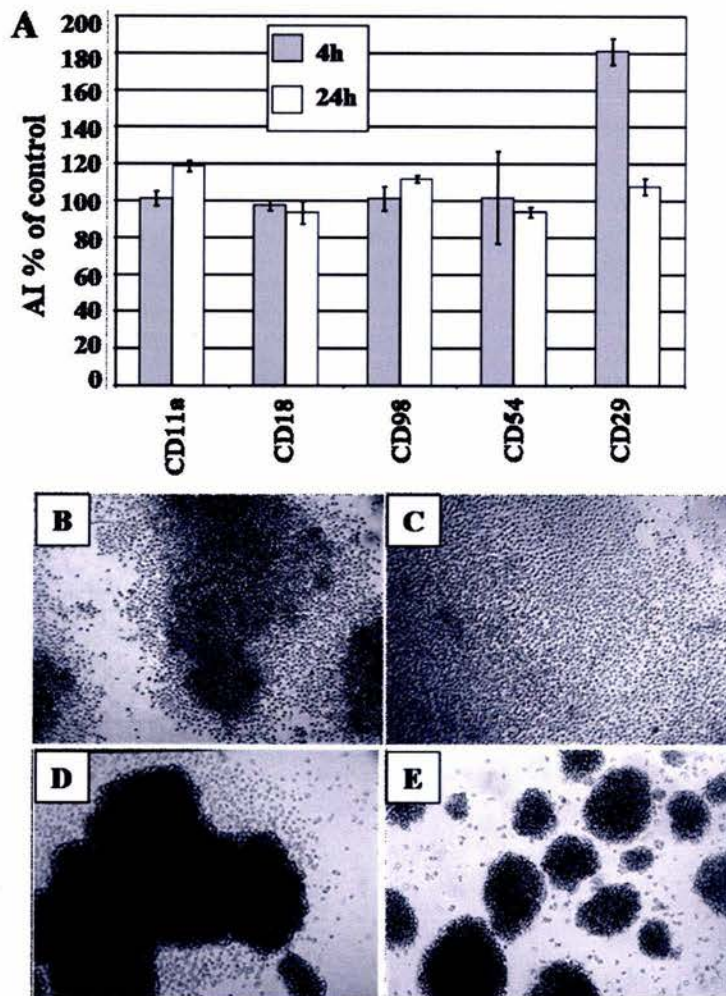
A pesar del hecho de que la expresión de las integrinas en membrana no se alteró, aún era posible que éstas participaran directamente en el fenómeno de adhesión. Por eso se probó la posible inhibición de la agregación por los anticuerpos específicos. Ninguno de los siguientes



**FIGURA 17. Durante la AH se produce regulación negativa de la expresión de CD13 pero no se modifica la expresión de integrinas.** La expresión de las moléculas indicadas se determinó por citometría de flujo tras 24 horas de incubación con o sin el anticuerpo 452 usando los mAbs específicos conjugados con FITC. Los histogramas frontales representan la expresión en células no agregadas (NAG). Los histogramas posteriores representan la expresión en células agregadas (AG). El histograma izquierdo en el panel de CD13 representa el control de células incubadas con un anticuerpo del mismo isotipo conjugado con FITC (Ctrl).

anticuerpos: anti-CD11a, anti-CD18, anti-CD54 y anti-CD98 tuvieron efectos significativos en la AH mediada por CD13 a ninguno de los tiempos de incubación o concentración probada (**Figura 18A**). Por el contrario, a tiempos tan cortos como 2 horas de incubación, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD29 indujo un incremento en la AH inducida por CD13 de hasta un  $201.8\% \pm 15.4$  mayor que la obtenida con el anticuerpo anti-CD13 sólo. A las 4 horas, la AH inducida por CD13 en presencia del anticuerpo anti-CD29 fue 80.9% mayor que la inducida por el anti-CD13 sólo. Sin embargo, a las 24 horas, las células agregándose en presencia del anticuerpo anti-CD13 sólo, habían alcanzado el mismo I.A. de aquéllas agregándose en presencia de ambos anticuerpos (anti-CD13 y anti-CD29, **Figura 18A**). Como ya se mencionó, a las 48 horas, la agregación inducida por CD13 empieza a disminuir (**Figura 18B**), hasta que a las 72 horas ha desaparecido completamente (**Figura 18C**). Sin embargo, las células permanecieron fuertemente agregadas a éstos tiempos de incubación cuando estaban en presencia del anticuerpo anti-CD29 sólo o en combinación con el anti-CD13 (**Figura 18D**). El anticuerpo anti-CD29 usado (clona 4B4), más no ninguno de los otros anticuerpos anti-integrinas, induce AH por sí sólo y lo hace con una cinética similar a la observada cuando se co-incuba con el anticuerpo anti-CD13. Esto sugiere que el efecto observado sobre la AH mediada por CD13 depende del CD29 únicamente y no de un efecto sinérgico entre los dos. Finalmente, la disminución de la AH mediada por CD13 después de las 48 horas también fue impedida por la co-incubación con anticuerpos anti-CD11a (**Figura 18E**) y anti-CD54 (no mostrado), en cuyo caso la agregación persistió hasta por 96 horas.

Estos resultados sugieren que aunque la AH mediada por CD13, parece ser independiente de integrinas, la ocupación de éstas moléculas puede incrementar la agregación aparentemente a través de la estabilización de los agregados inducidos por CD13.



**FIGURA 18. La AH mediada por CD13 no es inhibida por anticuerpos específicos para moléculas de adhesión. A.** Las células fueron incubadas con el mAb anti-CD13 452 en presencia de diferentes dosis de los anticuerpos indicados por 4 horas (barras grises) o por 24 horas (barras blancas) a 37°C. Ya que ninguna de las concentraciones tuvo ningún efecto sobre la AH mediada por CD13, para el gráfico se usaron los IA obtenidos con dosis saturantes de los anticuerpos según se determinó por citometría de flujo. Excepto en el caso del mAb anti-CD29, ninguno de los mAbs indicados indujeron AH en ausencia del mAb anti-CD13. **B.** AH obtenida con el mAb anti-CD13 452 solo a las 48 horas de incubación. **C.** AH obtenida con el mAb 452 solo a las 72 horas de incubación. **D.** AH obtenida a las 48 horas mediante la co-incubación del mAb 452 con el mAb anti-CD29. **E.** AH obtenida a las 48 horas mediante co-incubación del mAb 452 con el mAb anti-CD11a.

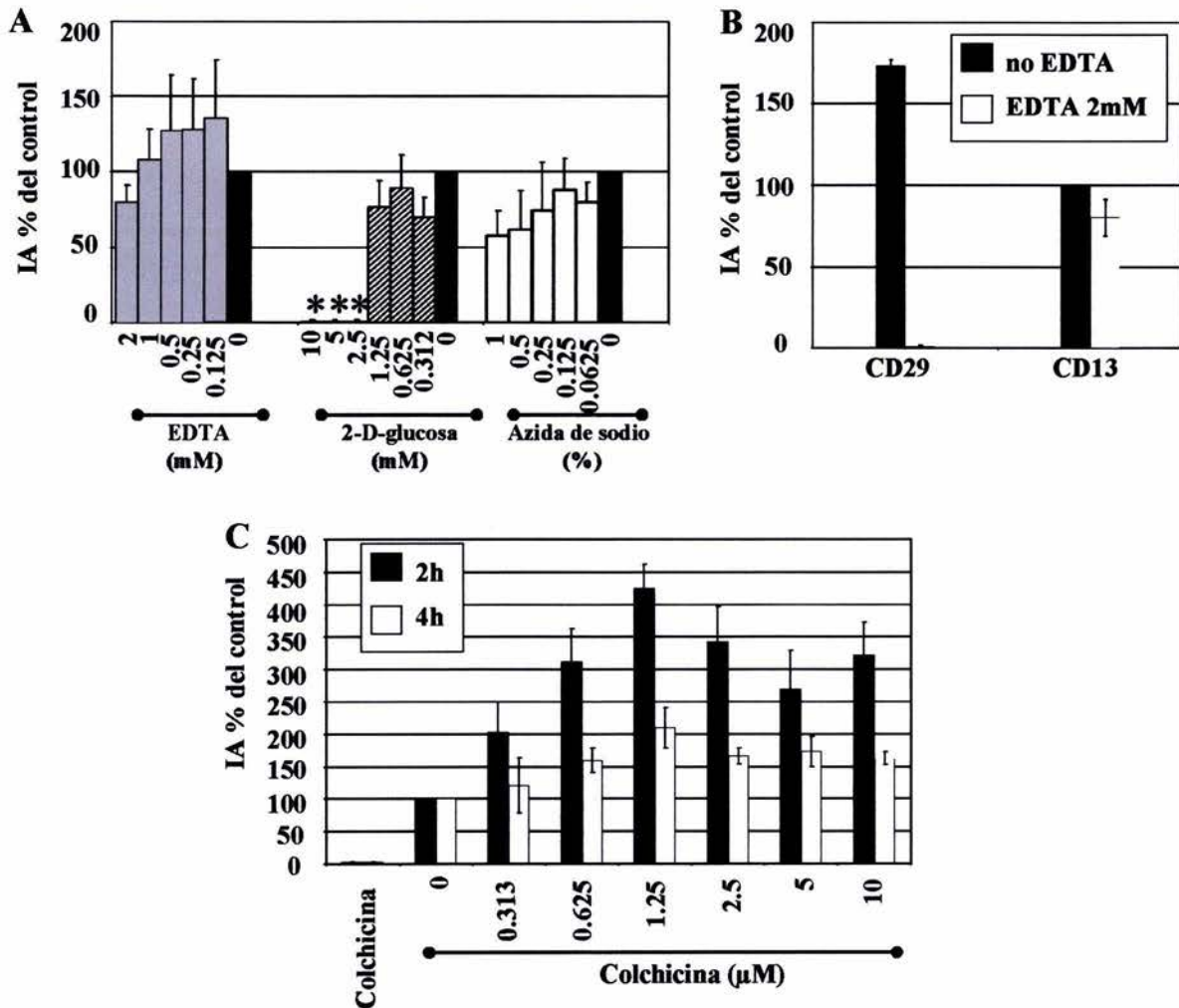
## 7.6 Requerimientos metabólicos de la agregación homotípica mediada por CD13

La AH es un proceso dinámico que involucra células metabólicamente activas. Para identificar las vías metabólicas que participan en la AH mediada por CD13, probamos el efecto de varios inhibidores metabólicos. Aunque las determinaciones en presencia de cada inhibidor se realizaron a las 4, 24 y 48 horas de incubación, sólo se presentan los resultados obtenidos a las 4 horas ya que la viabilidad celular resultó afectada a tiempos más prolongados de incubación.

En primer lugar, ya que la adhesión asociada a integrinas depende de calcio, evaluamos éste aspecto a través de la remoción del calcio libre del medio con EDTA. Como se muestra en la **Figura 19A**, la agregación inducida por CD13 no fue inhibida significativamente por ninguna de las concentraciones probadas de EDTA. La AH inducida por CD29 se usó como control porque su sensibilidad a EDTA ya había sido reportada (Cho *et al.*, 2001) y, como se esperaba, la agregación inducida por CD29 fue completamente inhibida por EDTA a las mismas concentraciones utilizadas para CD13 (**Figura 19B**).

A continuación, probamos dos inhibidores metabólicos, la 2-deoxiglucosa y la azida de sodio los cuales bloquean la glucólisis y el transporte de electrones en la cadena respiratoria, respectivamente. La 2-desoxiglucosa inhibió la agregación en un 99.01% (**Figura 19A**). La azida de sodio no inhibió significativamente la agregación a ninguna de las concentraciones probadas. Como otro indicador de la dependencia de energía de la AH mediada por CD13, se probó el efecto de la temperatura. La incubación a 4°C, inhibió completamente la AH mediada por CD13 (no se muestra).

Finalmente, para determinar el papel de los microtúbulos en la AH, se probó el efecto del inhibidor de la polimerización de microtúbulos colchicina. Como se observa en la **Figura 19C**, la AH inducida por anticuerpos anti-CD13 fue significativamente más alta que el control



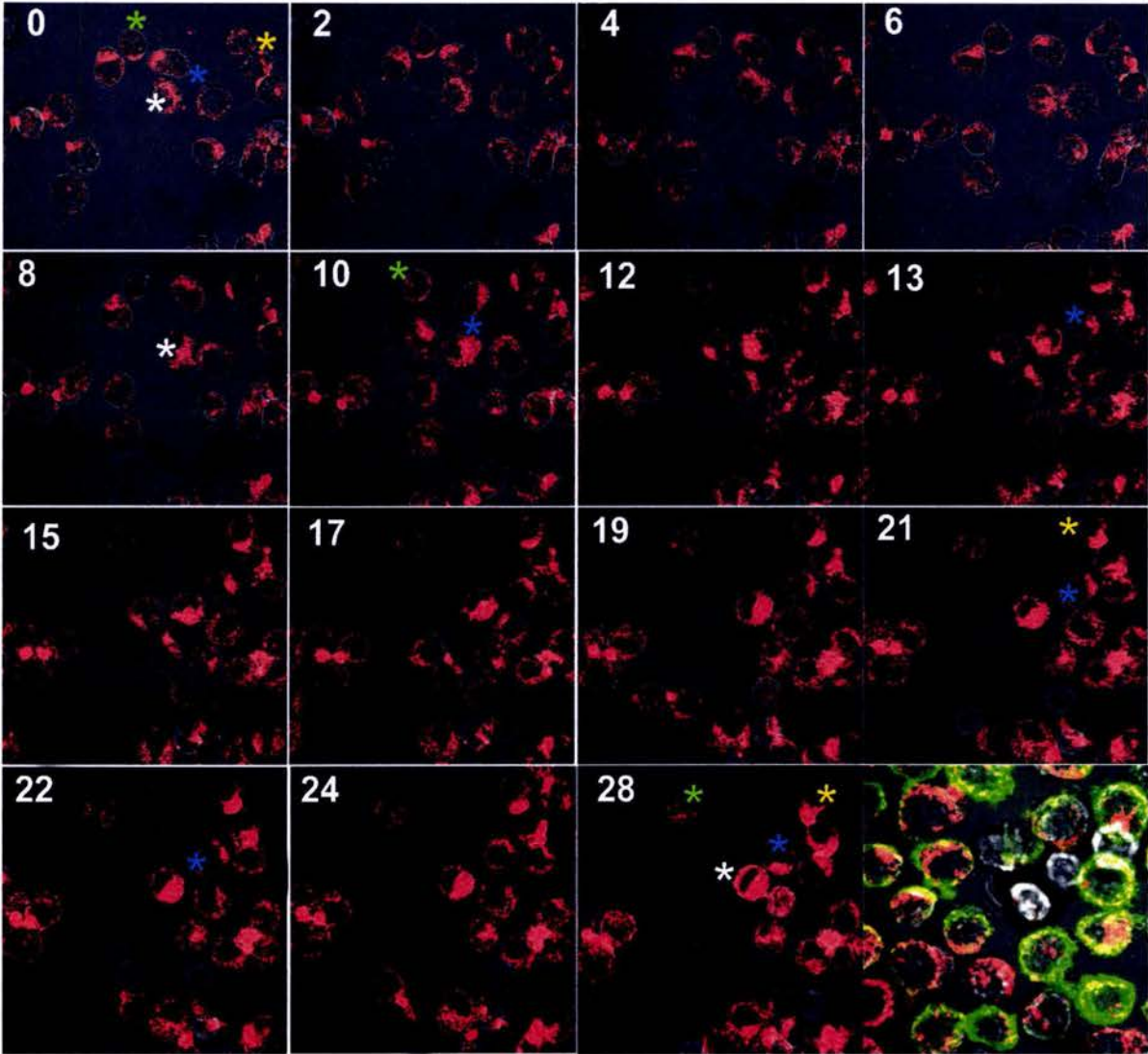
**FIGURA 19. Requerimientos metabólicos de la AH mediada por CD13.** A. Las células se incubaron durante 4 horas con el mAb anti-CD13 en presencia de las concentraciones indicadas de cada inhibidor. En la gráfica se muestra el porcentaje de agregación con respecto al control (células incubadas con el mAb anti-CD13 en ausencia de inhibidores, barras negras). Los asteriscos representan significancia estadística ( $p < 0.05$ ). B. La AH mediada por CD29, pero no aquella mediada por CD13, es inhibida en presencia de EDTA (2mM) a las 4 horas de incubación a 37°C. La gráfica corresponde al porcentaje de la agregación obtenida con respecto a las células control incubadas con el mAb anti-CD13 solo al durante el mismo periodo de tiempo. Nótese cómo la AH inducida por el anticuerpo anti-CD29 es mayor que aquella inducida por el mAb anti-CD13. C. Las células se incubaron con colchicina sola, con el mAb anti-CD13 solo (concentración 0 de colchicina), o con la combinación del mAb anti-CD13 y las concentraciones indicadas de colchicina. El IA se determinó a las 2 y 4 horas de incubación. Otra vez, lo que se muestra corresponde al porcentaje de agregación con respecto al control.



en presencia de todas las dosis de colchicina probadas. Este efecto estuvo presente a todos los tiempos de incubación aunque fue más evidente a tiempos cortos cuando la AH inducida por CD13 no había llegado a su máximo aún. Dosis aún mayores de colchicina de las mostradas en la gráfica (hasta de 30  $\mu\text{M}$ ), tuvieron el mismo efecto sinérgico (no mostrado). Estos resultados sugieren que la AH mediada por CD13 es un fenómeno activo, dependiente de energía y que es independiente de integrinas pero en el que los microtúbulos juegan un importante rol, aparentemente inhibidor.

### **7.7 CD13 redistribuye a la zona de contacto célula-célula durante la agregación homotípica**

A continuación, para determinar la localización de las moléculas de CD13 durante el fenómeno de agregación, la AH se indujo con fragmentos  $\text{F(ab)'}_2$  del anticuerpo anti-CD13 452 marcados con el fluorocromo Texas Red y los posibles cambios en la distribución de CD13 durante el proceso fueron monitoreados por microscopía confocal en tiempo real a 37°C. Como se observa en la **Figura 20**, durante la AH, el CD13 es polarizado y redirigido a las zonas de contacto célula-célula, con la mayor parte de la señal de CD13 localizada en aquéllas zonas cuando la agregación entre un determinado par o grupo de células se ha completado, lo que sugiere una participación activa de las moléculas de CD13 en el proceso de agregación. Como control, en algunos experimentos un anticuerpo anti-CD11a marcado con FITC se añadió junto con el anti-CD13 marcado con Texas Red. En estos experimentos, ningún cambio en la distribución membranal de CD11a se observó a ningún tiempo de incubación (**Figura 20**, imagen final).



**FIGURA 20. CD13 redistribuye a las zonas de contacto célula-célula durante la AH.** Las células U-937 fueron incubadas con el mAb anti-CD13 452 (0.39  $\mu\text{g/ml}$ ) en cajas de cultivo con fondo de vidrio con medio RPMI 1640 complementado y sin de rojo de fenol. Las imágenes de la AH en tiempo real se obtuvieron mediante un sistema de imagen para células vivas con intervalos de 2 minutos en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META equipado con un sistema de incubación con control de temperatura y calentador de objetivo. (Magnificación original x63). Las imágenes fueron analizadas y exportadas usando el programa Zeiss LSM Image Browser 3.5. Los números representan los tiempos de incubación. El tiempo 0 corresponde a 10 minutos de incubación a 37°C con el mAb antes de empezar a capturar las imágenes. La célula marcada con el asterisco verde redistribuye CD13 a la zona de su membrana más cercana a las células circundantes. Sin embargo, tan pronto como esas células empiezan a migrar y alejarse, la polarización de CD13 se pierde. La célula marcada con el asterisco azul, polariza el CD13 a la zona de su membrana por donde empieza a acercarse a las células circundantes. Esa proximidad se pierde (imagen de los 4 minutos), y la célula gira en dirección de las manecillas del reloj (imagen de los 10 minutos) hasta que relocaliza su zona de polarización de CD13 hacia sus nuevas compañeras de agregación (imagen de los 28 minutos). La célula marcada con el asterisco blanco se mueve progresivamente desde el centro del campo hacia el agregado mostrando mayores niveles de polarización de CD13 durante su migración. A los 10 minutos de incubación, otra célula se aproxima a su izquierda y la primera gira en dirección contraria a las manecillas del reloj mostrando a CD13 polarizado en dirección del contacto a los 13 minutos. Ya que ese contacto no se establece, la célula gira otra vez en dirección de las manecillas del reloj y termina estableciendo contacto con el resto del agregado principal localizado en la parte derecha inferior del campo. La célula marcada con el asterisco amarillo aparece claramente no polarizada al inicio de la incubación pero tan pronto como hace contacto con su pareja de agregación, comienza a girar en dirección contraria a las manecillas del reloj hasta que, al final de la incubación, presenta el CD13 polarizado en la zona de contacto célula-célula. Finalmente, la célula marcada con el asterisco verde, polariza CD13 durante el periodo de tiempo en que se encuentre en proximidad a otras células. Sin embargo, tan pronto como esas células empiezan a alejarse, se pierde esa polarización y la célula permanece en el mismo lugar durante toda la incubación. Esto indica que el movimiento celular no ocurre al azar ni es inducido por movimiento del sistema de incubación o del medio. Como control, un mAb anti-CD11a fue usado durante la AH inducida por el mAb anti-CD13. No hubo redistribución de CD11a a ningún tiempo de incubación (última imagen).

## 8. CONCLUSIONES (SEGUNDA PARTE)

Los fenómenos de adhesión entre células (homotípicos o heterotípicos), son de gran importancia tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Montoya *et al.*, 2002). Los cambios en las propiedades adhesivas de las células se deben a un sinnúmero de factores pero comúnmente se deben a variaciones en los niveles de expresión o afinidad de moléculas de adhesión. Estas variaciones ocurren en respuesta a diversos estímulos externos solubles o durante el establecimiento de contactos célula-célula o célula matriz. La AH *in vitro*, constituye un modelo muy útil para estudiar tales variaciones como respuesta a estímulos específicos y para estudiar las propiedades pro-adhesivas de determinadas moléculas.

Hemos observado que CD13 es capaz de inducir AH de la línea celular promonocítica U-937. Siempre se ha asumido que la mayor parte de las funciones atribuidas a CD13 dependen de su actividad enzimática, y por tanto se pensó que las diferencias en la habilidad de los distintos anticuerpos anti-CD13 para inducir AH pudieran depender de su efecto diferencial sobre la actividad enzimática. Sin embargo, la AH mediada por CD13 parece no depender de la actividad enzimática por varias razones:

- a) Los dos anticuerpos con mayor capacidad para inducir AH (452 y MY7) no tienen capacidad inhibidora sobre la actividad enzimática a dosis óptimas para inducir agregación, e incluso a dosis altas, su efecto sobre la actividad enzimática es muy escaso y sin significancia estadística.
- b) El anticuerpo WM-15 no induce agregación homotípica a dosis a las cuales más efectivamente inhibe la actividad enzimática. Más bien, induce AH a dosis a las cuales no tiene efecto sobre la actividad enzimática.

- c) El inhibidor de actividad aminopeptidasa Bestatina no bloquea la AH inducida por ninguno de los anticuerpos inductores de agregación.
- d) Finalmente, la AH inducida por CD13 es insensible a EDTA que se sabe que es un inhibidor irreversible de la actividad enzimática dependiente de Zinc de CD13 (See y Reithmeier, 1990; Ishii *et al.*, 2001).

Ya que la actividad enzimática parecía no estar involucrada, se pensó que las diferencias en la capacidad de los cuatro anticuerpos para inducir AH, podría deberse a diferencias en los epítomos que reconocen. Los ensayos de competencia revelaron que el epítomo reconocido por el anticuerpo 452 es el mismo o se encuentra muy cercano al reconocido por el MY7. Los estudios de mapeo de epítomos de CD13 previamente reportados, han mostrado que los anticuerpos MY7 y WM-15 se unen a epítomos distintos pero localizados muy cerca que se encuentran próximos al sitio enzimático activo (Ashmun *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren que la unión a un epítomo específico de CD13, localizado cerca de su sitio activo, es necesaria para inducir agregación. En concordancia, el anticuerpo WM-4.7 que se sabe que se une a un epítomo distinto al dominio de unión a Zinc del sitio activo, pero cuya unión no es bloqueada por ninguno de los anticuerpos inductores de AH, no induce agregación.

Es interesante la observación de que la unión a éste sitio, aún sin afectar la actividad enzimática, es suficiente para producir el efecto. Además, se sabe que tanto el anticuerpo MY7 como el WM-15, pero no el WM-4.7 bloquean la unión del coronavirus 229E humano al CD13 (Yeager *et al.*, 1992 y Breslin *et al.*, 2003), lo cual apoya la conclusión de que ambos anticuerpos se unen a epítomos muy cercanamente localizados. Finalmente, en otro estudio, tanto el MY7 como el WM-15 fueron capaces de inducir transducción de señales en células U-937 (Navarrete-Santos *et al.*, 2000a).

Ha sido reportado que la unión del anticuerpo anti-CD13 F23 (el cual es bloqueado por el WM-15), induce la exposición de epítomos crípticos de CD13 (epítomos reconocidos por el anticuerpo MY7) debido a un cambio conformacional en el dominio extracelular de CD13 (Xu *et al.*, 1997). Esto nos lleva a hipotetizar que la unión del anticuerpo WM-15 o la de los otros anticuerpos inductores de agregación, podría inducir ya sea la exposición de un epítomo críptico responsable de la unión de una molécula de adhesión o un cambio conformacional responsable del desencadenamiento de alguna cascada de señalización que active mecanismos pro-adhesivos, o ambos.

A continuación, ya que la mayor parte de los fenómenos de AH previamente reportados dependen de integrinas, se determinaron posibles cambios en su expresión y además se realizaron experimentos de inhibición de AH mediada por CD13 por parte de los anticuerpos específicos. A diferencia de la AH mediada por CD29 (Campanero *et al.*, 1990), CD43 (Cho *et al.*, 2003) o PMA (Rothlein y Springer, 1986), la agregación mediada por CD13 no depende de las moléculas LFA-1/ICAM-1 (CD11a-CD18/CD54) o CD29. Lo que se observó fue que la expresión de estas moléculas no cambió a ningún tiempo de incubación y que los anticuerpos específicos no tuvieron ningún efecto inhibitorio significativo en la AH mediada por CD13. Por el contrario, anticuerpos anti-CD11a, CD29 y en menor grado, anti-CD54, estabilizaron los agregados celulares, manteniéndolos intactos por períodos de tiempo más prolongados (**Figura 18B-E**). El anticuerpo anti-CD29 utilizado es capaz de inducir AH por sí sólo con la misma cinética y el incremento inducido por CD29 en la AH mediada por CD13, disminuye a las 24 horas cuando la AH mediada por CD13 sólo ha llegado a su máximo. Esto sugiere que la agregación inducida por el anticuerpo anti-CD29 es más estable y, por tanto, su efecto en la AH mediada por CD13 es un efecto estabilizador más que sinérgico. Como el EDTA inhibe la adhesión mediada por integrinas (CD29, Cho *et al.*, 2001 y **Figura 19B**), la observación de que el EDTA carece de efecto sobre la AH mediada por

CD13, apoya la conclusión de que la AH es un fenómeno que no depende ni de las integrinas probadas ni de ninguna otra integrina.

Si las integrinas no estaban relacionadas, existía la posibilidad de que la AH mediada por CD13 fuera un proceso pasivo debido a un fenómeno de aglutinación celular tipo lectina en lugar de un proceso activo y dependiente de energía. Para despejar esta duda, se probó el efecto de la temperatura. La incubación de las células en presencia de dosis óptimas del anticuerpo anti-CD13 a 4°C bloqueó la agregación completamente. Además, como se observa en la **Figura 19A**, la 2D-glucosa a concentraciones comúnmente usadas para bloquear la glicólisis, tuvo un efecto claramente inhibitor sobre la agregación. Estos resultados sugieren que la AH mediada por CD13 es un proceso activo, dependiente de energía y probablemente dependiente de transducción de señales. El hecho de que la azida de sodio, que bloquea el transporte de electrones en la cadena respiratoria, no haya inhibido el fenómeno de AH a las cuatro horas, es interesante porque sugiere que la AH mediada por CD13, puede proceder en condiciones de glicólisis anaerobia bajo las cuales la mayor parte de células tumorales crece.

El inhibidor de la polimerización de microtúbulos colchicina, tuvo un inesperado efecto sinérgico en la AH mediada por CD13. Un incremento en los I.A. se observó desde los tiempos más cortos de agregación (**Figura 19C**) y periodos más prolongados de incubación se acompañaron de un efecto similar al observado al co-incubar las células con anticuerpos anti-integrinas. Así, se observó una intensa agregación cuando las células incubadas con el anticuerpo anti-CD13 sólo, ya habían empezado a desagregarse. Este resultado concuerda con el reporte de que colchicina y nocodazol, incrementan la movilidad y activación de las integrinas y que el nocodazol por sí sólo es capaz de inducir agregación en la línea celular de macrófagos J774 (Zhou *et al.*, 2001) aunque bajo las condiciones utilizadas la colchicina no indujo agregación de las células U-937. Aunque lo que se trata de establecer es que la AH mediada por CD13 es *per se* independiente de integrinas, la estabilización de los agregados

celulares observada a periodos largos de incubación en presencia de anticuerpos contra algunas integrinas podría ser similar y aún relacionada con el efecto observado con colchicina. También es tentador proponer que otro tipo de mecanismo dependiente de microtúbulos opera durante la AH, por ejemplo, un incremento similar al de las integrinas en la movilidad de CD13 por su liberación del citoesqueleto. Al comparar la AH mediada por CD13 con la agregación inducida por otras moléculas en las células U-937, es interesante que las mismas dosis de colchicina han sido reportadas previamente como inhibidoras de la agregación mediada por CD98 y CD29 aunque no la mediada por CD43. Sería interesante determinar en el futuro, la existencia de alguna asociación funcional entre moléculas capaces de inducir AH. Sin embargo, con respecto a CD98, hemos determinado que anticuerpos contra ésta molécula carecen de un efecto inhibitor sobre la AH mediada por CD13.

La expresión en membrana de CD13 disminuye durante la AH. La regulación negativa de su expresión tanto al nivel proteico como del mensajero ha sido previamente relacionada con fenómenos de adhesión (Saito *et al.*, 1995 y Dybkær *et al.*, 2001). Esto sugiere que los fenómenos de adhesión en general podrían inducir una disminución en la expresión de CD13. Éste podría ser un mecanismo de regulación de la actividad aminopeptidasa en condiciones de contacto cercano célula-célula en las que podría ocasionar daño tisular. Además, podría ser un mecanismo de regulación del propio fenómeno de adhesión lo cual explicaría la desagregación de las células U-937 a tiempos prolongados de incubación.

En conclusión, se ha demostrado un fenómeno de adhesión que es mediado por CD13 y que puede ser fácilmente cuantificado. Estos resultados sientan las bases para trabajo futuro que se enfocará en determinar los mecanismos detrás de éste proceso así como sus posibles implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas. En el sistema inmune por ejemplo, CD13 y varias moléculas que se sabe son capaces de mediar AH, participan en la respuesta inmune (Woodhead *et al.*, 2000). En esos estudios se ha implicado a CD13 en la activación de



linfocitos T ya que anticuerpos anti-CD13 bloquean la activación inducida por células dendríticas *in vitro*. A la luz de los resultados presentados aquí, se podría proponer un papel de CD13 en la estabilización de éste tipo de interacciones célula-célula durante la respuesta inmune. Bajo estas circunstancias, CD13 podría actuar como una molécula de coestimulación o regulador de señal en sistema inmune, los cuales, como se comentó previamente, disminuyen el umbral de activación del MIRR, a través precisamente de la estabilización del contacto célula-célula y/o de la prolongación de la permanencia del MIRR en los dominios de control de señalización o balsas de lípidos como hemos propuesto que ocurre durante la señalización mediada por FcRs (Mina-Osorio y Ortega, 2004).

## 9. CONCLUSIONES FINALES

Los resultados presentados en esta tesis muestran que CD13 es capaz de actuar como una molécula de coestimulación o regulador de señal de FcγRs. El mecanismo por el cual CD13 potencia la fagocitosis mediada por FcγRs parece estar relacionado con su capacidad para incrementar la adhesividad celular y por tanto estabilizar el contacto célula-célula. Así, al mantener a los MIRRs por más tiempo en contacto con el inmunocomplejo (la partícula fagocítica), las señales que promueven la activación celular se prolongan y la capacidad para desencadenar la función efectora final se incrementa.

Como se mencionó en la introducción, en la activación de linfocitos a través de sus MIRRs, ciertas moléculas de adhesión como LFA-1/ICAM-1 estabilizan el contacto APC-linfocito disminuyendo la cantidad de antígeno requerido para que se lleve a cabo el fenómeno de activación celular y, al disminuir el umbral de activación, funcionan como moléculas de coestimulación que incrementan la activación celular. En el caso de CD13, se puede proponer que actúa como una molécula de adhesión que, igualmente, al mantener

estable por más tiempo el contacto entre el fagocito y el blanco fagocítico, disminuye el umbral de activación y al incrementar la activación celular (según se determinó por la prolongación en la fosforilación de Syk), incrementa también la capacidad celular para llevar a cabo la función efectora, en este caso, la fagocitosis.

Este fenómeno de incremento en la adhesión es claramente dependiente de actividad metabólica y probablemente depende de la inducción de una cascada de señalización que será estudiada en el futuro. Los resultados preliminares han mostrado que depende de la fosforilación en tirosina de cinasas de la familia Src. También se ha observado la asociación de CD13 con moléculas adaptadoras intracelulares como Grb2 y Sos. Estudios más profundos se requerirán para conocer con detalle los mecanismos bioquímicos de señalización detrás del fenómeno. Por lo pronto, con los resultados aquí presentados y los resultados preliminares mencionados se podría concluir que la coestimulación de monocitos mediada por CD13 pertenece al grupo de Reguladores de señal (SRs) con capacidad intrínseca para la señalización del grupo G (ver **Figura 4G**). En estos casos, la interacción simultánea del FcR y del SR (CD13) con sus ligandos respectivos estabiliza la interacción del blanco con la célula y por tanto la interacción del FcR con la partícula opsonizada con Ig. La señal resultante es una señal modulada “C” (en este caso, una señal incrementada. Ver figura 4G).

En cuanto a los posibles ligandos de CD13, como se mencionó en las conclusiones de la primera parte de este trabajo, hay varios candidatos. Entre ellos, sin duda, uno de los más importantes es el grupo de moléculas conocidas como Galectinas. Recientemente, se ha observado la asociación física entre CD13 y galectina-3 en células U-937 mediante experimentos de coimmunoprecipitación. Por tanto, se podría proponer que la unión de CD13 con galectina-3, de quien ya ha sido reportado un papel crucial en fenómenos de adhesión, es la responsable de la estabilización del contacto fagocito-célula blanco y por tanto, media el rol aquí descrito de CD13 como regulador de señal de Fc $\gamma$ Rs en monocitos humanos.

## 10. MATERIALES Y METODOS

### 10.1 Células y anticuerpos

La línea celular promonocítica U-937 (obtenida del ATCC, American Type Cell Culture Collection, Rockville, MD), se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen, Grand Island, N.Y.), piruvato de sodio 1mM, solución de aminoácidos no esenciales 2 mM, L-glutamina 0.1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (Invitrogen). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. El anticuerpo monoclonal (mAb) murino anti FcγRI (clona 32.2) fue purificado del sobrenadante del hibridoma correspondiente, obtenido de ATCC, y conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma, St. Louis, MO) mediante procedimientos estándares. El mAb murino anti-CD13 humano (clona 452, IgG1) fue igualmente purificado a partir del sobrenadante del hibridoma gentilmente donado por el Dr. Meenhard Herlyn del Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA. La producción de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo mediante digestión con Ficina inmovilizada en agarosa (Pierce, Rockford, IL) y la conjugación con el fluorocromo Texas Red<sup>®</sup>-X succinimidil ester (TR, Molecular Probes, Eugene, OR.), se realizaron según las instrucciones de los fabricantes. El mAb anti-CD13 humano WM-4.7, IgG1 y su conjugado con FITC fueron obtenidos de Sigma. El mAb anti-CD82 humano se obtuvo de BD Pharmingen, San Diego, CA. El mAb anti-CD13 clona WM-15 se obtuvo de BD Pharmingen. Los mAbs anti-CD13 humano (clona MY7), anti-CD98 (clona 4F2), anti-CD18 (clona inhibidora de la adhesión 7E4), anti-CD11a (clona inhibidora 25.3), anti-CD54 (clona inhibidora 84H10), anti-CD29 (clona 4B4) y sus conjugados con FITC, se obtuvieron de Coulter-Immunotech, Miami, FL. El mAb anti-CD33 (P67.6) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Los anticuerpos anti-fosfotirosina (PY20 and PY99) y el polyclonal anti-Syk (N-19) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. El mAb anti-DNP 3B5 (IgG<sub>2b</sub>), utilizado como anticuerpo opsonizante en los ensayos de fagocitosis para microscopía confocal, fue purificado a partir del sobrenadante del hibridoma correspondiente y conjugado con FITC. Los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC ó HRP, la estreptavidina conjugada con TR y los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> biotinilados del anticuerpo de cabra anti- IgG de ratón fueron de Zymed, San Francisco, CA. Los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón y su conjugado con TR fueron de Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA.

## **10.2 Monocitos humanos de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos.**

Células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas por centrifugación por gradientes de densidad a partir de paquetes leucocitarios obtenidos de donadores sanos usando la solución Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) según ya se había descrito (Montaner, 1996). Luego de cuatro lavados, se cultivaron por 45 minutos a 37°C en medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 5% de suero autólogo derivado de plasma, piruvato de sodio 1mM, solución de aminoácidos no esenciales 2 mM, L-glutamina 0.1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (Invitrogen) para permitir la adhesión de los monocitos al plástico. Las células no adherentes se descartaron mediante lavados y las células adherentes enriquecidas en monocitos (más de 95% de pureza según se determinó por citometría de flujo usando los marcadores CD14 y CD33), fueron cultivadas por 48 horas en atmósfera húmeda a 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se cosecharon los monocitos usando gendarmes de plástico estériles. Los macrófagos derivados de monocitos se obtuvieron tras cultivar los monocitos obtenidos con el protocolo anterior por 6 días en presencia de suero autólogo derivado de plasma como ya se había descrito (Montaner, 1996 y Davies, 2004)

## **10.3 Fagocitosis por microscopía confocal de escaneado con láser.**

Eritrocitos de carnero fueron lavados en solución DGVB<sup>2+</sup> (2.5% dextrosa, 0.05% gelatina, 2.5mM Veronal, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> y 0.15mM CaCl<sub>2</sub>) y sensibilizados con sal sódica de ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico en buffer de boratos (Acido bórico 200mM, NaCl 150mM, pH 8.5) por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron dos veces en solución DGVB<sup>2+</sup> y una vez en medio de cultivo RPMI libre de suero. Para la opsonización, los eritrocitos sensibilizados fueron incubados durante 60 minutos a temperatura ambiente con concentraciones sub-hemaglutinantes del mAb anti-DNP 3B5 (IgG2b) marcado con FITC o con el mAb anti-DNP no marcado. Los anticuerpos libres fueron eliminados mediante varios lavados. Para el ensayo de fagocitosis, los eritrocitos opsonizados fluorescentes se incubaron por distintos tiempos a 37°C con monocitos humanos primarios o células U-937 en medio RPMI complementado con suero, en atmósfera húmeda y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Al mismo tiempo, otros monocitos o células U-937 fueron incubados bajo las mismas

condiciones con eritrocitos no opsonizados o eritrocitos opsonizados con el anticuerpo no fluorescente. Tras la incubación, se lavaron las células en PBS frío y, cuando se indique, fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 1% por 20 minutos. A continuación se las incubó con los fragmentos del mAb anti-CD13 452 conjugados con TR a 4°C por 30 minutos, se centrifugaron brevemente en picrofuga y se montaron en portaobjetos de vidrio [medio de montaje: 50% v/v PBS/glicerol con 0.1% de 1,4-Diazabicyclo (2.2.2) Octano (DABCO)] para su análisis en un microscopio confocal marca Zeiss modelo LSM 510. En otras muestras, fragmentos biotinilados del anticuerpo anti-CD13 se incubaron con las células tras la fagocitosis por 30 minutos a 4°C. Luego de dos lavados, se añadió estreptavidina conjugada con TR por 20 minutos más, se centrifugaron las células y se montaron como se indicó arriba. En el microscopio, se generaron cortes en el plano X-Y de cada imagen obtenida. Sólo el corte más apropiado se muestra en las Figuras. Donde se indica, los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico antes de la tinción para CD13. La incubación con estreptavidina-TR sólo no produjo una tinción detectable.

#### **10.4 Fagocitosis selectiva CD13/FcγRI**

Los eritrocitos de carnero modificados (EBS-Abs) se prepararon por una técnica previamente descrita (Edberg, 1992) con algunas modificaciones. Brevemente, los eritrocitos (a una concentración de  $1 \times 10^9$ /ml en buffer de carbonatos, pH 8.6) se incubaron con 125 µg/ml de sulfo-NHS-biotina (Pierce) por 20 minutos a 4°C. A continuación, se cubrieron con estreptavidina (125 µg/ml, Calbiochem) mediante incubación por 30 minutos a 4°C. Los eritrocitos obtenidos (cubiertos con biotina y estreptavidina) se lavaron y se incubaron con los fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> biotinilados del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón por 30 minutos a 4°C. De ésta manera se obtuvieron los eritrocitos denominados [EBS-Ab, Eritrocito, Biotina, eStreptavidina-Anticuerpo (Ab)].

Para el ensayo de fagocitosis, los monocitos, los macrófagos derivados de monocitos o las células U-937 fueron pre-incubadas con las concentraciones indicadas de los anticuerpos anti-FcγRI, anti-CD13 o ambos (completos o sus fragmentos F(ab)'<sub>2</sub>), en una relación de 1 monocito:25-50 EBS-Ab a 37°C por 20 a 30 minutos en el caso de monocitos humanos primarios o por 90 minutos en el caso de las células U-937. Finalmente, tras la lisis de los EBS-Ab no internalizados por choque hipotónico, se cuantificó la fagocitosis por microscopía de luz. Los datos se expresan como índices fagocíticos (número de EBS-Ab

internalizados/100 células). El análisis estadístico se llevó a cabo usando una prueba t pareada con un nivel de significancia de 0.05.

### **10.5 Análisis de la fosforilación de Syk inducida por coagregación de FcγRs y CD13**

Una suspensión de  $3 \times 10^6$  células se lava y resuspende en medio de cultivo RPMI sin SFB para detener la proliferación celular. A continuación se añade el anticuerpo primario (32.2 anti-FcγRI, IV.3 anti-FcγRII, anti-CD13 o ambos) y se incuba a 4°C durante 10 minutos. Luego de una centrifugación de 10 segundos en picofuga, se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µl de medio conteniendo el anticuerpo secundario cabra anti-ratón (20µg) para luego incubar a 37°C durante 3, 5, 10, 15 o 20 minutos. Una muestra de control se mantiene durante todo el experimento en hielo. Luego de una nueva centrifugación se resuspende el pellet celular en buffer de lisis con Tritón X-100 al 1% (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM, Glycerol al 5%, pH 7.5) con los inhibidores: Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) 1mM, Fluoruro de Sodio (NaF) 10mM, y 1 µg/ml de Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A y Ortovanadato de Sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Se incuban en hielo durante 15 minutos y luego de centrifugar a 14000 r.p.m. durante 15 minutos para separar la fracción insoluble, se añade buffer de Laemmli reductor al sobrenadante y se procede a la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. A continuación se lleva a cabo la transferencia a membrana de nitrocelulosa en cámara semi-seca. El western blot anti-fosfotirosina se realiza luego de someter la membrana de nitrocelulosa a una fase de bloqueo durante toda la noche a 4°C con TBS-Tween 20 0.2% y 3% de BSA. Como anticuerpos primarios se utilizó una mezcla de los anticuerpos PY-20 SC-508 y PY99 SC- 7020 (Santa Cruz Biotech.) en una dilución de 1:1000. Luego de lavar con TBS-Tween 0.2% se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP en una dilución de 1:5000 durante una hora a 37°C. La detección se realizó por quimioluminiscencia en un aparato Fluor-S Multi-imager de Bio-Rad. Finalmente, el blot anti-Syk se realizó luego de dos períodos de elusión a 70°C durante 45 minutos cada vez con 5 lavados intermedios. Se bloqueó durante una hora con TBS-Tween 20 y BSA 3%. Se incubó con el anticuerpo anti-Syk (N-19 SC-1077 de Santa Cruz Biotech.) durante 1 hora a TA y a continuación con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP durante 1 hora para revelado por quimioluminiscencia tal como se describió anteriormente. La densitometría se realizó utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad).

## 10.6 Colocalización y coreistribución por microscopía confocal

Para los estudios de colocalización, los monocitos humanos de sangre periférica o las células U-937 ( $2.5 \times 10^5$  / 300  $\mu$ l), fueron fijados en PFA al 1% por 20 minutos en hielo, lavados e incubados por 15 minutos en hielo con buffer de bloqueo (Suero fetal bovino al 5% y azida de sodio 0.1% en PBS). Tras añadir fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> del anticuerpo primario (anti-Fc $\gamma$ RI, 10  $\mu$ g), las células fueron incubadas por 30 minutos a 4°C. Luego de dos lavados, se añadieron fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> del anticuerpo secundario conjugado con FITC en una dilución de 1:300 por 30 minutos más a 4°C. Luego de lavar, se añadieron los fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> biotinilados del mAb anti-CD13 por 30 minutos a 4°C los cuales fueron detectados con estreptavidina conjugada con TR incubada durante otros 30 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas y montadas para su análisis en el microscopio según el mismo procedimiento indicado arriba para la fagocitosis por microscopía confocal. En ciertos experimentos, se usaron anticuerpos directamente conjugados (anti-Fc $\gamma$ RI-FITC y anti-CD13-TR).

Para los experimentos de coreistribución, los monocitos o células U-937 fueron incubados con el mAb anti-Fc $\gamma$ RI por 30 minutos a 4°C. Luego de dos lavados, se añadieron los fragmentos del anticuerpo secundario conjugado con FITC por 20 minutos a 4°C y a continuación a 37°C por diferentes periodos de tiempo para permitir la agregación del Fc $\gamma$ RI. Tras dos lavados más, las células fueron fijadas en PFA al 1% durante 20 minutos a 4°C. CD13 fue detectado como en los experimentos de colocalización antes descritos en presencia de azida de sodio. Las células fueron montadas para el análisis por microscopía confocal. El experimento opuesto también se realizó, induciendo la agregación del CD13 en primer lugar con fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> del anticuerpo anti-CD13 marcado con TR, seguidos de fragmentos de un anticuerpo secundario no marcado. Luego de fijar las células, se detectó la distribución del Fc $\gamma$ RI con un anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI directamente marcado.

## 10.7 Ensayos de agregación homotípica

Las células U-937 ( $5 \times 10^4$ ) en 20  $\mu$ l de medio RPMI-1640 fueron colocadas en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano e incubadas con o sin el mAb anti-CD13 a la concentración indicada. Un volumen equivalente de medio con o sin los inhibidores indicados, se añadió a cada pozo y se llevó a cabo la incubación a 37°C por diferentes periodos de tiempo (0.5, 1, 2, 3, 4, 24, 48 y 72 horas). La agregación celular se cuantificó por

microscopía de luz y se presenta como Porcentaje de agregación (número de células agregadas/número total de células x 100). Debido a que el tamaño de los agregados luego de 4 horas de incubación hizo imposible la cuantificación por microscopía óptica, se obtuvieron imágenes de cada pozo usando una cámara fotográfica acoplada al microscopio invertido (Zeiss Axiovert) y la cuantificación de la agregación se realizó usando la función de conteo de colonias del programa Quantity One (Bio-Rad). Los datos representan Indices de Agregación (IA) = [número de células detectadas por el programa como colonias azules (células agregadas)/número total de células x 100]. El efecto de los distintos inhibidores se expresa como IA, porcentaje del control = IA obtenido con el mAb anti-CD13 en presencia del inhibidor/IA obtenido con el mAb sólo (control) x 100. El programa fue ajustado para detectar como colonias azules todos los agregados formados por más de 3-4 células que presentan densidades ópticas suficientes para evitar la detección errónea de dos células cercanas como si fueran agregados. Por lo tanto, ya que al cuantificar por microscopía óptica se tomaron en cuenta incluso los pares de células, los índices de agregación obtenidos por cuantificación con el programa son menores numéricamente pero comparables a los obtenidos por conteo visual. Ambas evaluaciones correlacionaron consistentemente durante toda la experimentación. Los inhibidores usados: EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético), azida de sodio, colchicina y 2-D-glucosa se obtuvieron de Sigma. En el caso de estos inhibidores, únicamente se presentan los resultados obtenidos a las 4 horas debido a que la viabilidad celular fue afectada a tiempos mayores de incubación.

### **10.8 Ensayos de competencia entre anticuerpos anti-CD13 por inmunofluorescencia**

Las células U-937 ( $2.5 \times 10^4$ ) fueron incubadas por 5 minutos en el buffer de bloqueo (PBS/SFB al 5%/azida de sodio al 0.1%). Concentraciones saturantes del mAb anti-CD13 indicado, se añadieron e incubaron por 30 minutos a 4°C. A continuación, concentraciones saturantes del mAb competidor se añadieron e incubaron por 30 minutos más a 4°C. Luego de dos lavados, un anticuerpo secundario conjugado con FITC se añadió e incubó por otros 30 minutos. Finalmente, luego de lavar, las células fueron fijadas en PFA al 1% por 20 minutos y analizadas por citometría de flujo. Algunos de estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Linda H. Shapiro, University of Connecticut Health Center.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



## **10.9 Determinaciones de actividad enzimática de aminopeptidasa**

La actividad enzimática aminopeptidasa se determinó por la medición colorimétrica de la hidrólisis del sustrato L-alanin-p-nitroanilida (H-Ala-pNA, Bachem Biosciences, King of Prussia, PA.) como se ha descrito previamente (Ashmun, 1992). Brevemente, las células ( $5 \times 10^5$ ), fueron pre-incubadas con los mAbs o inhibidores indicados en PBS con SFB al 10% por 1 hora a 37°C. A continuación, se añadió el sustrato a una concentración final de 6mM por 1 hora a 37°C. Se centrifugaron las células y se determinó la absorbancia en los sobrenadantes a 405 nm. Los datos presentados como porcentaje del control representan el promedio de las absorbancias obtenidas en por lo menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y normalizados para el control de células incubadas sin ningún anticuerpo o inhibidor antes de añadir el sustrato. La dosis inhibidora máxima de bestatina fue determinada en experimentos previos (0.4 mg/ml). El cocktail de inhibidores de proteasas usado como control negativo para bestatina (Complete Mini EDTA-free) se obtuvo de Roche Diagnostics, Indianapolis, IN. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Linda H. Shapiro, University of Connecticut Health Center.

## **10.10 Localización subcelular de CD13 por microscopía confocal en tiempo real**

La agregación homotípica de las células U-937 suspendidas a una concentración de  $2 \times 10^6$  cells/ml se indujo en cajas de cultivo con fondo de vidrio (MatTek Corp., Ashland, MA) usando fragmentos F(ab)<sub>2</sub> del mAb anti-CD13 452. Los cambios en la localización de CD13 fueron seguidos en un microscopio confocal marca Zeiss modelo LSM 510 META equipado con un sistema de incubación a 37°C con calentamiento de platina y objetivo a un aumento de 63X. Se obtuvieron imágenes sucesivas (time-series) a un intervalo de 1 ó 2 minutos durante todo el proceso de agregación (aproximadamente 45 minutos a 1 hora). Como control, un mAb anti-CD11a marcado con FITC se usó junto con el anti-CD13 marcado con TR en algunos experimentos. Las imágenes fueron analizadas con el programa Zeiss LSM Image Examiner. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Linda H. Shapiro, University of Connecticut Health Center.

## 11. REFERENCIAS

- Abraham, C., Griffith, J., Miller, J. (1999) The Dependence for Leukocyte Function-Associated Antigen-1/ICAM-1 Interactions in T Cell Activation Cannot Be Overcome by Expression of High Density TCR Ligand. *J. Immunol.* 162: 4399–4405.
- Aderem, A., Underhill, D. (1999) Mechanisms of phagocytosis by macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623
- Allen, L., Aderem, A. (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 184:627-637
- Amoscato A., Prenovitz, D., Lotze, M. (1998) Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. *J. Immunol.* 161, 4023-4032
- Arienti, G., Carlini, E., Verdacchi, R., Cosmi, E.V., Palmerini, C.A. (1997) Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N. *Bioch. Bioph. Acta* 1336:533-538
- Ashmun, R., Look, T. (1990) Metalloprotease Activity of CD13/Aminopeptidase N on the Surface of Human Myeloid Cells. *Blood* 75, 462-469
- Ashmun, R., Shapiro, L., Look, T. (1992) Deletion of the Zinc-Binding Motif of CD13/Aminopeptidase N Molecules Results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies. *Blood.* 79, 3344-3349
- Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Fernandez, G.C., Gomez, S., Alves-Rosa, M.F., Palermo, M.S., Isturiz, M.A. (2003) Immune complex-FcγR interaction modulates monocyte/macrophage molecules involved in inflammation and immune response. *Clin Exp. Immunol.* 133, 200-207.
- Bauvois, B. (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 23, 317-329
- Bhagwat, S., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R. Shapiro, LH. (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97, 652-652
- Bhagwat, S., Petrovic, N., Okamoto, Y. and Shapiro, LH. (2003) The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood* 101, 1818-1826
- Bischoff, J. (1997) Cell adhesion and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 99:373-376

- Booth, J.W., Trimble, W.S., Grinstein, S. (2001) Membrane dynamics in phagocytosis. *Sem. Immunol.* 13:357-364
- Breslin, J., Mork, I., Smith, K., Vogel, L., Hemmila, E., Bonavia, A., Talbot, P., Sjöström, H., Norén, O., Holmes, K. (2003) Human Coronavirus 229E: Receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37°C. *J. Virology.* 77, 4435-4438
- Campanero, M., Pulido, R., Ursa, Rodriguez-Moya, A., de Landazuri, M. O. Sanchez-Madrid, F. (1990) An Alternative Leukocyte Homotypic Adhesion Mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, Triggered through the Human VLA-4 Integrin. *J. Cell Biol.* 110, 2157-2165
- Chambers, C. (2001) The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.* 22:217-223
- Cheng P.C., Dykstra, M.L., Mitchell, R.N., Pierce, S.K. (1999) A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* 190, 1549-1560
- Cherukuri A., Cheng, P., Sohn, H. Pierce, S. (2001) The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* 14, 169-179
- Cho, J., Chain, B., Vives, J., Horejsi, V. and Katz, D. (2003) Regulation of CD43-induced U-937 homotypic aggregation. *Exp. Cell Res.* 290, 155-167
- Cho, J., Fox, D., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K., Katz, D. and Chain, B. (2001) The functional interactions between CD98,  $\beta$ 1-integrins, and CD147 in the induction of U-937 homotypic aggregation. *Blood* 98, 374-382
- Chomarat, P., Rissoan, M.C., Pin, J.J., Banchereau, J., Miossec, P. (1995) Contribution of IL-1, CD14 and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J. Immunol.* 155, 3645-3652
- Clynes, R, Ravetch, J.V. (1995) Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity.* 3, 21-26
- Cox, D., Greenberg, S. (2001) Phagocytic signaling strategies: Fcy receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Sem. Immunol.* 13, 339-345
- Crowley, M., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tymbulewicz, V.L. and de Franco, A.L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186,1027-1039

- Daëron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman W. (1995) The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 3:635-646
- Daëron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234
- Danielsen M.E., Deurs B. (1997) Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol. Biol. Cell* 8,2241-2251
- Davies, J., Gordon, S. (2004) Isolation and Culture of human macrophages. In *Basic Cell Culture Protocols*. (C. Helgason, and C. Miller. eds.) Humana Press, Totowa, NJ, 105-116
- Delmas, B., Gelfi., J., Kut., E., Sjöstrom, H., Norén, O., Laude., H. (1994) Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J. Virology*. 68:5216-5224
- Dermine J.F., Duclos, S., Garin, J. (2001) Flotilin-1 enriched rafts domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* 276,18507-18512
- Dong, X, An, B., Salvuci, L., Storkus, W., Amoscato, A. Salter, R. (2000) Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J. Immunol.* 164, 129-135
- Durden, DL., Kim, HM., Calore, B., Liu, Y. (1995) the FcγRI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J. Immunol.* 154:4039-4047
- Dybkær K, Olesen G, Pedersen FS, Kristensen JS. (2001) Stromal-mediated down-regulation of CD13 in bone marrow cells originating from acute myeloid leukemia patients. *Eur. J. Haematol.* 66, 168-177
- Edberg J, Kimberly R. (1992) Receptor specific probes for the study of Fcγ receptor specific function. *J. Immunol. Methods* 148, 179-187
- Field K.A. (1997) Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J. Biol. Chem.* 272,4276-4280
- Frauwirth, K., Thompson, C. (2002) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109:295-299

- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, PH., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J., Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*. 110:119-131
- Galandrini, R., Palmieri, F., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (1996) CD16-mediated p21 Ras activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 183:179-186
- Ghazizadeh, S., Bolen, JB., Fleit, HB. 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269:8878-8884
- Glinsky, V., Glinsky, G., Glinskii, O., Huxley, V., Turk, J., Mossine, V., Deutscher, S., Pienta, K., Quinn, T. (2003) Intravascular metastatic cancer cell HA at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 63, 3805-3811
- Greenberg, S. (1999) Modular components of phagocytosis. *J. Leuk. Biol.* 66:712-717
- Griffin, FM., Griffin, JA., Leider, JE., Silverstein, SC. (1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J. Exp. Med.* 142, 1263-12128
- Hoffmann T., Faust, J., Neubert, K., Ansorge, S. (1993) Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett.* 336, 61-64
- Hooper, N. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* 354, 1-6
- Houde M, Bertholet S., Gagnon, E., Brunet S., Goyette G., Laplante A., Princiotta M., Thibault P., Sacks D. and Desjardins M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406
- Hulett, M., Hogarth, M. (1994) Molecular Basis of Fc Receptor Function. *Adv. Immunol.* 57:1-127
- Indik, Z.K., Park, J.G., Hunter, S., Schreiber, A.D. (1995) The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399
- Ioan-Facsinay A, de Kimpe, S.J., Hellwig, S.M., van Lent, P.L., Hofhuis, F.M., van Ojik, H.H., Sedlik, C., da Silveira, S.A., Gerber, J., de Jong, Y.F., Roozendaal, R., Aarden, L.A., van den Berg, W.B., Saito, T., Mosser, D., Amigorena, S., Izui, S., van Ommen, G.J., van Vugt, M., van de Winkel, J.G., Verbeek, J.S. (2002) Fc $\gamma$ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16, 391-402

- Ishii, K., Usui, S., Sugimura, Y., Yoshida, S., Hioki, T., Tatematsu, M., Yamamoto, H., Hirano, K. (2001) Aminopeptidase N regulated by Zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *Int. J. Cancer.* 92,49-54
- Kanayama, N., Kajiwara, Y., Goto, J., el Maraduy, E., Maehara, K., Andou, K., Terao, T. (1995) Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J. Leukoc. Biol.* 57, 129-134
- Kasinrer, W., Tokrasinwit N., Phunpae, P. (1999) CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U-937 via LFA/ICAM-1 pathway. *Immunology.* 96, 184-192
- Keegan, A.D., Paul, W.E. (1992) Multichain immune recognition receptors. *Immunol. Today.* 13, 63-68
- Kido, A., Krueger, S., Haeckel, C., Roessner, A. (2003) Inhibitory effect of antisense aminopeptidase N (APN/CD13) cDNA transfection on the invasive potential of osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Met.* 20, 585-592
- Knight, P.J., Carroll, J., Ellar, D.J. (2004) Analysis of glycan structures on the 120KDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 101:112
- Kono H., Suzuki, T., Yamamoto, K., Okada, M. Yamamoto, T., Honda, Z.I. (2002) Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc $\gamma$ R signaling. *J. Immunol.* 169,193-203
- Koval, M., Preiter, K., Adles, C., Stahl, P., Steinberg, T. (1998) Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. *Exp. Cell Res.* 242, 265-273
- Kuhlman, P., V. T. Moy, B. Lollo, A., Brian, A. (1991) The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation: contributions of adhesion and co-activation. *J. Immunol.* 146:1773.
- Küster H, Thompson H, Kinet, J-P. 1990. Characterization and expresión of the gene for the human Fc receptor  $\gamma$  subunit. Definition of a new gene family. *J. Biol. Chem.* 265:6448-6452
- Kwiatkowska K., Frey, J., Sobota, A. (2002) Phosphorylation of Fc $\gamma$ RIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: role of membrane rafts. *J. Cell Science.* 116, 537-550

- Langlet C., Bernard, A.M. Drevot, P. He, H.T. (2000) Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 12,250-255
- Lanier L. (2001) Face off- the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 326-331
- Lanier, L., Yu, G., Philips, JP. (1989) Co-association of CD3 $\zeta$  with a receptor (CD16) for IgG Fc on human NK cells. *Nature.* 342:803-805
- Larsen S.L., Pedersen, L.O., Buus, S., Stryhn, A. (1996) T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J. Exp. Med.* 184, 183-189
- Larsson, S., Sodeberg-Naucler, C., Moller, E. (1998) Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13 positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation* 65, 411-415
- Le Conait, M., Kinet, J-P., Berger, R. (1990) The human genes for the  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits of the mast cell receptor for immunoglobulin E are located on human chromosome band 1q23. *Immunogenetics* 32, 183-186
- Lebel-Binay S., Lagaudière, C., Fradelizi, D., Conjeaud, H. (1995) CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U-937 monocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.* 57, 956-963
- Lenschow, D., T. Walunas, Bluestone, J. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233.
- Li, N., Mak, A., Richards, D., Naber, C., Keller, B., Li, L., Shaw, A. (2003) Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics* 3, 536-548
- Lohn, M, Mueller, C., Lagner, J. (2002) Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk. Lymphoma.* 43, 407-413
- Löhn, M., Mueller, C., Thiele, T., Kähne, D., Riemann, D., Lagner J. (1997) Aminopeptidase N-mediated signal transduction and inhibition of proliferation of human myeloid cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421, 85-91
- Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, OConnell PJ, Gerkis V, d'Apice AJ, Sagawa K, Peiper SC. (1989) Report of the CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop, in Knapp W (ed): *Leucocyte Typing IV*. Oxford, UK, Oxford, , p 784

- MacIntyre, E.A., Roberts, P.J., Jones, M., van der Schoot, C.V.E., Favalaro, E.J., Tidman N. (1989) Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. *J. Immunol.* 142, 2377-2383
- Mandrell, RE, Apicella, MA, Lindstedt, R., Leffler, H. (1994) Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Meth. Enzymol.* 236, 231-254
- Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J., Herlyn, M. (1993) Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* 53:1450-1455
- Mina-Osorio, P., Ortega, E. (2004) Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes? *Trends Immunol.* 25, 529-535
- Mina-Osorio, P., Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *J. Leuk. Biol.* 2005;77:1008-1017
- Montaner, L., Collin, M., Herbein, G. (1996) Human Monocytes: Isolation, Cultivation, and Applications. In Weir's Handbook of Experimental Immunology. (L. Herzenberg, DM. Weir, L. Herzenberg, and C. Blackwell, eds.) Blackwell Publishers, Cambridge, Mass, 155.1-155.11
- Montixi C., Langlet, C., Bernard, A.M., Thimoniev, J. C. Dubois, M.A. Wurbel, J.P. Chauvin, M Pierres, He, H.T. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17, 5334-5348.
- Montoya, M., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F. (2002) Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol. Rev.* 186, 68-82
- Navarrete-Santos A., Langner, J., Herrmann, M., Riemann, D. (2000a) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cellular Immunol.* 201, 22-32
- Navarrete-Santos A., Langner, J., Riemann, D. (2000b) Enzymatic activity is not a precondition for the intracellular calcium increase mediated by mAbs specific for aminopeptidase N/CD13. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 43-47
- Navarrete-Santos A., Roentsch, J., Danielsen, M., Lagner, J., Riemann, D. (2000c) Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269,143-148
- Oldenborg, P.A., Gresham, AD., Lindberg, FP. (2001) CD47-signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) regulates Fc $\gamma$  and complement receptor-mediated phagocytosis. *J. Exp. Med.* 193,855-861.



- Olsen J., Cowell, G.M., Konigshofer, E. (1988) Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.* 238, 307-314
- Olsen, J., Kokholm, K., Noren, O., Sjöstrom, H. (1997) Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421,47-57.
- Orloff, D.G., Ra, C., Frank, S.J., Klausner, R.D., Kinet, J-P. (1990) Family of disulphide-linked dimmers containing the  $\zeta$  and  $\mu$  chains of the T cell receptor and  $\gamma$  chain of Fc receptor. *Nature* 347, 189-191
- Paul, S., Taylor, L.S., Stansbury, E.K. McVicar, D.W. (2000) Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96,483-490
- Ravetch, J.V., Bolland, S. (2001) IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290
- Ravetch, J.V., Kinet, J-P. (1991) Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9,457-492
- Ravinovitch, M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 5:85-87
- Riemann, D., Kehlen, A., Langner, J. (1999) CD13 – not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 20, 83-88
- Rittig, M., Wilske, B., Krause, A. (1999) Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microb. Infect.* 1:727-735
- Rothlein, R., Springer, TA. (1986) The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med.* 163, 1132-1149
- Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Motowo, N., Tsuruo, T. and Azuma, I. (1993) Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer.* 54, 137-143
- Saito, M., Kumagai, M., Okazaki, T., Nakazawa, S., Shapiro, L.H., Look, A.T., Campana, D. (1995) Stromal cell-mediated transcriptional regulation of the CD13/aminopeptidase N gene in leukemic cells. *Leukemia.* 9, 1508-1516
- Scornik, O., Botbol, V. (2001) Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr. Drug. Metab.* 2,67-85
- See, H., Reithmeier, R.A. (1990) Identification and characterization of the major stilbene-disulphonate-and concanavalin A-binding protein of the porcine renal brush-border membrane as aminopeptidase N. *Biochem. J.* 271, 147-155

- Sigalov, A. (2004) Multichain immune recognition receptor signaling: different players, same game? *Trends Immunol.* 25, 583-589
- Sinclair, N.R. (1999) Why so many coinhibitory receptors? *Scand. J. Immunol.* 50, 10-13
- Sjöstrom, H., Norén, O., Olsen, J. (2000) Structure and function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 477, 25-34.
- Sodeberg C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., Moller, E. (1993) CD13 (Human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 67, 6576-6585
- Takai T. (2002) Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Rev. Immunol.* 2, 580-592.
- Tokuda, N., Levy, R. (1996) 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 244-250
- Tse, S., Tse, M.L., Furuya, W. Gold, E., Schreiber, A.D., Sandvig, K., Inman, R.D., Grinstein, S. (2003) Differential Role of actin, clathrin, and dynamin in Fc-receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 278:3331-3338
- Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M., Takeya, R., Sumimoto, H., Saito, N. (2005) Isoform-specific membrane targeting mechanism of Rac during FcR-mediated phagocytosis: positive charge-dependent and independent targeting mechanism of Rac to the phagosome. *J. Immunol.* 175:2381-2390
- Ulyanova, T., Blasioli, J., Woodford-Thomas, TA., Thomas, ML. (1999) The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.* 29,3440-3449
- Underhill, M., Ozinsky, A., Hajjar, A., Stevens, A., Wilson, C., Bassetti, M., Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815
- Salmon, J. E., J. C. Edberg, R. P. Kimberly. 1996. FcγR on neutrophils. J. G. J. van de Winkel, and J. A. Capel, eds. *Human IgG Fc Receptors* 79. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Van Vugt M.J., Van de Winkel J.G.J. (2001) Fc Receptors. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature publishing group. [www.els.net](http://www.els.net). pp. 1-8

- Vivier, E., Morin, P., O'Brien, C., Druker, B., Schlossman, SF., Anderson, P. (1991) Tyrosine phosphorylation of the Fc $\gamma$ RIII (CD13): $\zeta$  complex in human natural killer cells. *J. Immunol.* 146:206-210
- Ward P.E., Benter, I.F., Dick, L., Wilk, S. (1990) Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase. *Mol. Biochem. Pharmacol.* 40, 1725-1732
- Weintraub, B., Goodnow, C. (1998) Immune Responses: costimulatory receptors have their say. *Curr. Biol.* 8:575-577
- Weissman, A.M., Hon, D., Orlaff, D.G., Modi, W.S., Seunanz, H., O'Brien, S.J., Klausner, R.D. (1988). Molecular cloning and characterization of the human T-cell receptor  $\zeta$  chain: Distinctive from the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9709-9713
- Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Edwards, M.H., Galyov, E.E. (1996) SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* 22, 327-38
- Woodhead V.E., Stonehouse, T.J., Binks, M.H., Speidel, K., Fox, D.A., Gaya, A., Hardie, D., Henniker, A.J., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K.M., Taskov, H., Todd 3rd, R.F., van Agthoven, A., Katz, D.R., Chain, B.M. (2000) Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* 12, 1051-1061
- Worthington, R.E., Carroll, RC., Boucheix, C. (1990) Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. *Br. J. Haematol.* 74,216-22.
- Xu, Y., Wellner, D., Scheinberg, D. (1997) Cryptic and regulatory epitopes in CD13/aminopeptidase N. *Exp. Hematol.* 25, 521-529
- Yeager C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Gaudelicko., C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. Holmes. K.V. (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature.* 357, 420-422
- Yu X. J., Luo, C., Lin, J.C., Hao, P., He, Y.Y., Guo, Z.M., Qin, L., Su, J., Liu, B.S., Huang, Y., Nan, P., Li, C.S., Xiong, B., Luo, X.M., Zhao, G.P., Pei, G., Chen, K.X., Shen, X., Shen, J.H., Zou, J.P., He, W.Z., Shi, T.L., Zhong, Y., Jiang, H.L., Li, Y.X. (2003) Putative hAPN receptor binding sites in SARS-CoV spike protein. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 481-488

- Zhou, X., Li, J., Kucik. D.F. (2001) The microtubule cytoskeleton participates in control of beta2 integrin avidity. *J Biol Chem.* 30;276, 44762-44769

## **APENDICE I: Abreviaturas**

**AH** Agregación homotípica

**BCR** Siglas en inglés de receptor de células B (B Cell Receptor)

**CCDA** Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

**DNP** Dinitrofenol

**EBS-Ab** Eritrocitos de carnero modificados, esto es, cubiertos con biotina, estreptavidina y anticuerpos anti-IgG de ratón biotinilados.

**EDTA** Acido etilendiaminotetraacético

**FcεRs** Receptores para la porción Fc de la IgE

**FcγRs** Receptores para la porción Fc de la IgG

**FITC** Isotiocianato de fluoresceína

**IA** Índice de agregación

**ICAM-1** Siglas en inglés de molécula de adhesión intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)

**IF** Índice fagocítico

**IgG** Inmunoglobulina G

**ITAM** Siglas en inglés de secuencia consenso de activación basada en tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif)

**ITIM** Siglas en inglés de secuencia consenso de inhibición basada en tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif)

**LFA-1** Siglas en inglés de antígeno asociado a la función leucocitaria 1 (Leukocyte Function-Associated Antigen-1)

**mAb** Anticuerpo monoclonal

**MIRRs** Siglas en inglés de receptores multcadena de reconocimiento inmune (Multichain Immune Recognition Receptors)

**SFB** Suero Fetal Bovino

**SIRP $\alpha$**  Siglas en inglés de proteína reguladora de la señalización alfa (Signal Regulatory Protein  $\alpha$ )

**TCR** Siglas en inglés para el receptor de células T (T Cell Receptor)

**TR** Texas Red

## **APENDICE II: Artículos publicados**

- Mina-Osorio, P., Ortega, E. (2004) Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes? *Trends Immunol.* 25, 529-535
- Mina-Osorio, P., Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *J. Leuk. Biol.* 2005;77:1008-1017

# Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes?

Paola Mina-Osorio and Enrique Ortega

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228 Ciudad Universitaria, D.F. C.P. 04510, México

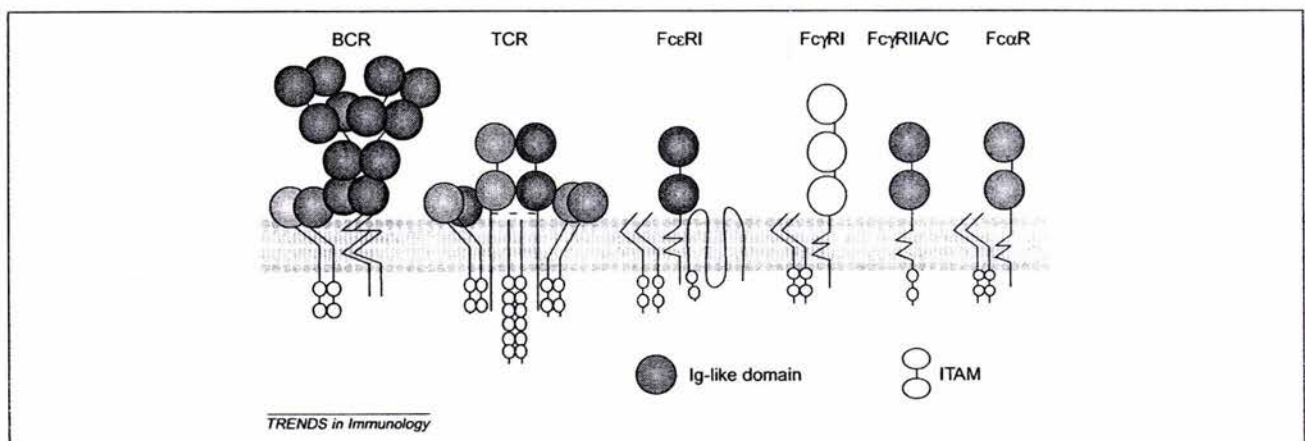
**Leukocyte membrane receptors for the Fc portion of Igs (FcRs) link antigen recognition by antibodies to effector functions involved in immune phenomena, from pathogen elimination to autoimmunity. Moreover, they also signal for the synthesis and secretion of cytokines and chemokines, thus having a role in immune homeostasis. Even though the structural and functional similarities between FcRs and the clonotypic antigen receptors of lymphocytes (the T-cell receptor and B-cell receptor) are well established, participation of regulatory membrane molecules in leukocyte activation by FcRs has rarely been considered. Here, we summarize evidence demonstrating that FcR-mediated signaling could be modulated by other membrane molecules (signal regulators), and propose that comprehension of this phenomenon is essential for understanding the functions of FcRs, knowledge of which could then be used for therapeutic interventions.**

Membrane receptors for the Fc portion of Igs (FcRs) are glycoproteins that have fundamental roles in the immune system, coupling antigen recognition by antibodies (Abs) to diverse effector functions of hematopoietic cells, such as phagocytosis, endocytosis, Ab-dependent cell cytotoxicity, degranulation, generation of reactive oxygen and nitrogen intermediates, clearance of immune complexes and

transcriptional activation of cytokine- and chemokine-encoding genes. Receptors specific for each Ab class have been described. This Review focuses on the leukocyte FcRs belonging to the Ig superfamily: Fc $\alpha$ RI (for IgA), FcRI (for IgA), Fc $\epsilon$ RI (for IgE) and Fc $\gamma$ Rs (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII) (for IgG). Their gene and protein structure and functions have recently been reviewed [1,2].

FcRs share many structural and functional features with the antigen receptors of B and T lymphocytes [the B-cell receptor (BCR) and the T-cell receptor (TCR)], with which they form the family of multichain immune recognition receptors (MIRRs) [3] (Figure 1). Crosslinking of any of the MIRRs on the surface of a competent cell triggers a signaling cascade that leads to cell activation. Signaling initiated by all MIRRs follow similar biochemical routes, involving Src kinase-mediated phosphorylation of the immune tyrosine-based activation motifs (ITAMs) present in the cytoplasmic domain of associated signaling chains (Figure 1), which sequentially promotes binding and activation of Syk/ZAP70 ( $\zeta$ -chain associated protein of 70 kDa) kinases essential for initiation of downstream signaling pathways.

B- and T-cell responses induced by stimulation through the BCR or TCR depend not only on physicochemical parameters of the receptor aggregates, but also on simultaneous engagement of other membrane molecules







**Figure 1.** Multichain immune-recognition receptors (MIRRs). Receptors involved in antigen recognition by leukocytes share structural and functional characteristics. They all belong to the Ig superfamily and are associated with signaling subunits that contain immune tyrosine-based activation motifs (ITAMs). All MIRRs trigger similar intracellular signaling cascades.

Corresponding author: Enrique Ortega (ortsoto@servidor.unam.mx).

Available online 26 August 2004



Table 1. Structural characteristics of putative signal regulators of the Fc receptor

Family	Proposed structure <sup>b</sup>	Major characteristics	Reported interactions	Refs
Tetraspanins		Tetraspanins are predicted to have four hydrophobic transmembrane domains, de-limiting two extracellular and one intracellular loops, with the N- and C-termini forming short cytoplasmic tails. The transmembrane domains contain highly polar residues capable of hydrogen bonding. To date, ~30 tetraspanins have been described in mammals; the best characterized are CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151 and Uroplakins.	FcγRII-CD9 FcεRI-CD9 FcγRII-CD151 FcγRIII- and FcγRI-CD82 FcεRI-CD81	[10-18,19, 24,25-28]
Siglecs		Most of them possess large cytoplasmic tails that contain putative or established ITIMs or other Ser/Thr phosphorylation sites. The extracellular portion is formed by between two to 10 Ig-like domains. Currently, ten Siglecs have been described; the best known are the first ones to be identified: sialoadhesin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3) and MAG (Siglec-4).	FcγRI-CD33 FcγRI-MIS	[29-31]
SIRPs		SIRPs were first described as a family of tyrosine phosphorylated molecules tightly associated with the phosphatase SHP-2. They can be divided into two subtypes: α or β, according to the presence or absence of the cytoplasmic SHP-2 binding domain. SIRPs are members of the Ig superfamily, with three immunoglobulin domains in their extracellular portion. In the cytoplasmic domain, they contain ITIMs that inhibit signaling by growth factor receptors, integrins and FcRs.	FcεRI-IRPα FcγRs-SIRPα	[40,41]
ILTs		ILTs are a family of ≥10 receptors predominantly expressed on myeloid cells. They have an extracellular portion formed by two or four Ig-like domains, a transmembrane domain and an intracellular domain, which contain ITIMs. Some ILTs have short cytoplasmic domains without ITIMs and are able to mediate signal transduction by using ITAMs present in the proteins with which they associate. This association depends on the transmembrane domain, which contains a positively charged residue that permits the association of ILTs with 'adapter' proteins, such as the γ-chain of FcγRs. Furthermore, there is one ILT (ILT6) that lacks the transmembrane and cytoplasmic domains, possibly being secreted as a soluble receptor.	FcγRIII-ILT3 FcεRI-ILT4 and -ILT5 FcγRII-ILT4 and -ILT2 FcR γchain-ILTs?	[35-39]

Abbreviations: ILTs, Ig-like transcripts, ITAMs, immune tyrosine-based activation motifs; ITIMs, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs; MAG, myelin-associated glycoprotein; MIS, myeloid inhibitory siglec; SHP-2, Src homology 2 domain-containing phosphatases-2; SIRPα, signal regulatory protein α.

<sup>b</sup>Large circles represent Ig-like domains; small red circles represent ITIMs; gray rectangles represent the cell membrane.

(co-stimulatory molecules and co-receptors), which can modulate the intensity of the biochemical signal and, in many cases, even determine the nature of the response.

Although the structural and functional similarities of FcRs with the TCR and the BCR are well established, little is known about the possible modulation of FcR-mediated cellular activation by other membrane molecules, apart from the cooperation described between various FcγRs with members of the integrin family of molecules [4]. Here, we summarize multiple observations showing that FcR-mediated functions can be modulated by membrane molecules that can be called signal regulators (SRs) (Table 1), and propose that full comprehension of the interactions between FcRs and SRs is a key factor for understanding the biological function of this diverse family of receptors.

### Tetraspanins

Tetraspanins are a family of proteins expressed on virtually every human cell [5]. Because of their extraordinary capacity to interact with many other molecules and the wide range of functions in which they participate, they are considered 'molecular facilitators', implicated in the formation, stabilization and function of membrane protein complexes [6,7].

Although the possibility of cooperation between

tetraspanins and FcRs has been scarcely explored, some reports have already shown *in vitro* that it can actually take place. For instance, platelet activation induced by monoclonal Abs (mAbs) specific for different tetraspanins expressed on the platelet membrane depends on FcγR engagement. The best characterized example is the interaction between CD9 and FcγRII.

Anti-CD9 mAbs induce a variety of functions in different cells, such as neurite formation, aggregation of pre-B cells, activation of T cells and inhibition of cell motility and metastasis. However, CD9 has no structural features associated with signaling capabilities and, therefore, the biochemical mechanisms involved in these effects are largely unknown. Probably, some of the reported phenomena require the CD9-commanded engagement of other molecules with signaling capacity.

FcγRII participates in platelet activation induced by the anti-CD9 mAb SYB-1 because anti-FcγRII mAbs totally blocked the anti-CD9 mAb-induced response and F(ab)<sub>2</sub> fragments of the Ab failed to induce the response [8]. The mAb ALB6 also induces platelet activation by simultaneously binding through its Fab portion to CD9 on one platelet and through its Fc to the FcγRII on another [9]. Furthermore, the agonistic activity of mAb ALB6 depends on its ability to bind to FcγRs [10].

The anti-CD9 mAb NNKY1-19 also induces platelet activation in an Fc $\gamma$ RII-dependent manner and persistent binding of the mAb Fc portion to Fc $\gamma$ RII is required to sustain the Ca<sup>2+</sup> influx [11]. However, platelet activation induced by Fc $\gamma$ RII crosslinking is biochemically different from that induced by the anti-CD9 mAb and, although crosslinking of CD9 alone can trigger an activating signal, this activation requires Fc $\gamma$ RII [12]. Similar findings have been reported with this and other mAbs by other groups [13,14].

In murine macrophages, anti-CD9 mAbs induce several responses in an Fc $\gamma$ RIIB and/or R $\gamma$ RIII-dependent manner, such as activation, aggregation, Syk phosphorylation and filopodium extension. Furthermore, CD9 and Fc $\gamma$ Rs colocalize in phagosomes during internalization of IgG opsonized particles, suggesting an association of Fc $\gamma$ RIIB and/or Fc $\gamma$ RIII with CD9. Also, a functional association between Fc $\gamma$ RI and CD9 was suggested [15].

Further evidence of the participation of CD9 in the formation of membrane signaling complexes that include FcRs was provided by Higginbottom *et al.* [16]. They reported activation of rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) transfected with human CD9 by intact anti-CD9 mAb of the IgG1 isotype (which binds to Fc $\epsilon$ RI). This effect could not be reproduced by F(ab)<sub>2</sub> fragments of the anti-CD9 mAb or by an anti-CD9 mAb of the IgG2a isotype. The participation of Fc $\epsilon$ RI was corroborated by the inhibition of the activation by monomeric murine IgE but not by IgG1 [16].

The mAb 14A2.H1 recognizes the tetraspanin CD151 and induces platelet aggregation and mediator release. This response depends on the mAb interaction with both the specific antigen and Fc $\gamma$ RII. The effect can be blocked by an anti-Fc $\gamma$ RII mAb and is not observed with F(ab)<sub>2</sub> fragments of the anti-CD151 mAb, implying that engagement of Fc $\gamma$ R is essential [17].

CD82 is another tetraspanin with a broad pattern of expression. It was first described as a protein related to susceptibility to LAK (lymphokine-activated killer) lysis on B cells [18] and as an inhibitor of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)-induced syncytium formation [19]. It has co-stimulatory activity on T cells and is considered a differentiation marker of monocytes [20,21]. The anti-CD82 mAb IA4 triggered signal transduction events in U-937 cells that seemed to depend on simultaneous binding to CD82 and to an Fc $\gamma$ R (Fc $\gamma$ RIII or Fc $\gamma$ RI) because F(ab)<sub>2</sub> fragments of the Ab were unable to induce cell activation. CD82 crosslinking with intact anti-CD82 Ab induced a Ca<sup>2+</sup> signal in a small population of cells, suggesting a weak constitutive association of Fc $\gamma$ Rs with CD82. The number of responder cells increased greatly after crosslinking both molecules with secondary Abs. Furthermore, the induction of a Ca<sup>2+</sup> increase by avidin crosslinking of complete biotinylated anti-CD82 mAbs was blocked by anti-Fc $\gamma$ R mAbs, further supporting Fc $\gamma$ R participation in the activation phenomenon [22].

CD81 is another tetraspanin capable of modulating FcR signaling. CD81 is part of various membrane complexes, the best known being the CD81-CD19-CD21 complex on B cells. CD81 has been proposed to have a role in enabling a low affinity BCR-antigen interaction to elicit a primary

immune response by reducing, along with CD19 and CD21, the threshold for B-cell activation [23]. CD81 expression by activated T cells enhances cognate T-B-cell interactions and induces interleukin-4 (IL-4) synthesis by B cells, resulting in Th2 polarization [24]. However, CD81 can also mediate inhibitory functions. Its original name, TAPA-1 (target of antiproliferative Ab), was given on account of the inhibition of proliferation of human T-cell lines [25]. Two different anti-CD81 mAbs inhibit Fc $\epsilon$ RI-mediated activation of RBL-2H3 mast cells *in vitro* and passive cutaneous anaphylaxis *in vivo* [26].

All the given examples provide clear evidence of functional interactions between tetraspanins and FcRs. Because tetraspanins have no known signaling elements, the signals observed after crosslinking them could result from the activity of associated molecules rather than that of the tetraspanins *per se*. This is supported by their dependence, in some cases, on FcRs, in order for the responses observed to be proficient. It has been suggested that the role of the network formed by tetraspanins, the 'tetraspanin web', is to regulate the arrangement of membrane molecules depending on the cellular response required, directing the grouping of signaling molecules at the appropriate place and time. FcRs, as linkers between innate and adaptive immune responses, would constitute important participants in the tetraspanin web and further investigation of their physical or functional association will be of great relevance.

#### Sialic acid-binding Ig-like lectins

Sialic acid-binding Ig-like lectins (Siglecs) are expressed preferentially on hematopoietic cells. Most of them contain immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)-like sequences in their intracellular domains, suggesting their participation in the negative regulation of immune-cell activation. Work devoted to find evidence supporting this assumption is in progress. In B cells, Siglec-2 (CD22) has the ability to negatively regulate signaling through the BCR [27]. Evidence of inhibition of FcR-induced signaling by Siglecs has been reported. Thus, Siglec-3 (CD33), a type-I transmembrane glycoprotein with two Ig-like extracellular domains, acts as an inhibitory receptor in monocytes. Co-engagement of CD33 and Fc $\gamma$ RI inhibits Fc $\gamma$ R-induced calcium mobilization and protein phosphorylation through the recruitment of both Src homology 2 domain-containing phosphatase-1 and -2 (SHP-1 and SHP-2) [28]. It was suggested that CD33-mediated inhibition of Fc $\gamma$ R activation 'would allow for CD33<sup>+</sup> cells to ignore stimuli that would otherwise result in cellular activation' [29].

Another Siglec capable of acting as an inhibitory receptor is mouse myeloid inhibitory siglec (MIS), which contains two ITIM sequences. Co-aggregation of Fc $\gamma$ RI with MIS resulted in an important decrease in Ca<sup>2+</sup> mobilization [30].

Because sialic acids are absent from most pathogens [31], Siglecs on the membrane of effector cells could interact with sialic acids when encountering a host cell, thus preventing it from inducing activation, whereas the lack of sialic acids on a cell would enable its recognition as a 'non-self' cell. The implications of this phenomenon for

virally infected cells and immune responses against some microorganisms capable of synthesizing or taking sialic acids from host cells have been discussed by Crocker and Varki [32], underlining the importance of Siglec-mediated inhibitory signals in immune responses.

### Ig-like transcripts

As is the case for Siglecs, the inhibitory potential of some Ig-like transcripts (ILTs) is due to the presence of ITIM motifs in their intracellular domains, which has been shown in various models (reviewed in Ref. [33]). Thus, in macrophages, co-ligation of ILT3 and Fc $\gamma$ RIII inhibited the Ca<sup>2+</sup> signal induced by this Fc $\gamma$ R [34]. ILT4 or ILT5, stably expressed in RBL-2H3 cells, inhibited serotonin release induced by Fc $\epsilon$ RI crosslinking. In myelomonocytic cells, co-engagement of ILT4 and Fc $\gamma$ RII inhibits Ca<sup>2+</sup> mobilization triggered by the latter [35]. Similar results were reported for ILT2 [36].

Conversely, other members of the ILT family, such as ILT1, ILT8, ILT6a, ILT7, and eight of the murine counterparts of ILTs, named paired Ig-like receptors (PIRs), can induce activatory signals by their association with the  $\gamma$  chain common to several FcRs. However, it is not yet known if Fc $\gamma$  actually transduces the signal that leads to ILT-mediated cell activation [37,38].

In conclusion, the presence of ITIM motifs in the intracellular tails of some ILTs and the association of other ILTs with proteins capable of mediating signal transduction through ITAM motifs suggest that they might have important regulatory functions in FcR-mediated leukocyte activation.

### Signal regulatory proteins

The first evidence of regulation of FcR-mediated functions by signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) was the demonstration that co-aggregation of Fc $\epsilon$ RI with a chimeric molecule containing the intracellular portion of SIRP $\alpha$  led to the inhibition of Fc $\epsilon$ RI-mediated cytokine secretion and mediator release [39].

Shortly after, it was reported that CD47, a ubiquitously expressed molecule, is a ligand for SIRP $\alpha$ . CD47 on normal red blood cells (RBCs) binds to SIRP $\alpha$  on macrophages, inhibiting Fc $\gamma$ R- and complement-mediated phagocytosis through the recruitment of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. In humans, CD47 is associated with Rhesus blood group antigens. The inhibition of erythrophagocytosis by SIRP $\alpha$  is thought to prevent the development of hemolytic anemia because unopsonized erythrocytes from CD47-deficient mice are rapidly phagocytosed by macrophages from wild-type, syngenic mice. Both CD47-deficient and wild-type RBCs are more rapidly phagocytosed as the level of opsonization with IgG increases, demonstrating that the CD47-SIRP $\alpha$  signal counteracts that mediated by Fc $\gamma$ Rs [40].

This type of mechanism used by inhibitory molecules through their binding to diverse ligands in other cell types for regulation of Fc $\gamma$ R-mediated signals might be implicated not only in the physiological control of RBC clearance but also in microbe phagocytosis and destruction.

### Other molecules

In 1989, McIntyre *et al.* showed that activation signals in monocytes induced by mAbs recognizing the antigens CD13, CD14, class II MHC and CD35 resulted from the mAb-induced formation of membrane complexes between the corresponding antigens and Fc $\gamma$ Rs because the effect could not be reproduced using F(ab)<sub>2</sub> fragments of the Abs, and it varied according to the isotype of the mAb tested [41].

Likewise, in platelets, mAbs against several membrane molecules have FcR-dependent stimulatory or inhibitory activity. Among them is OKM5, a mAb that recognizes CD36, whose agonistic effects require complete Ab, whereas F(ab)<sub>2</sub> fragments not only do not induce the response but also block the activity of the intact mAb [42]. Another mAb, B2.62.2, which recognizes  $\beta$ 2-microglobulin, induces an equivalent effect in platelets and, furthermore, the anti-Fc $\gamma$ RII mAb IV.3 inhibits the phenomenon [43]. Similar results have been obtained with both UR1 and W6/32 mAbs that bind CD41 and HLA class I antigens, respectively [44,45]. Finally, Horsewood *et al.* tested mAbs against 16 different platelet membrane molecules and found six capable of inducing platelet aggregation and secretion. In all these cases, activation required mAb interaction with FcRs [46].

From these examples, it has been proposed that opsonization and crosslinking of FcRs in platelets might constitute a natural mechanism of activation by anti-platelet Abs [43]. Taylor *et al.*, using transgenic mice expressing human Fc $\gamma$ RIIA in platelets and macrophages, have shown that anti-CD9 mAbs that activate platelets in an FcR-dependent manner can cause thrombosis, shock and death. They also observed a correlation between intravascular platelet activation as a cause of injury versus the protective role of splenic clearance of non-activating Ab-coated platelets [47]. The implications of these findings in human immune-mediated thrombocytopenic disorders have been reviewed [48].

In RBL-2H3 mast cells, co-aggregation of mast-cell function-associated antigen (MAFA) with Fc $\epsilon$ RI inhibits IgE-induced activation [49].

Finally, recent evidence indicates that Toll-like receptors (TLRs) are functionally associated with Fc $\gamma$ Rs, both in IgG-mediated phagocytosis by macrophages and in dendritic-cell activation by IgG complexes [50,51]. TLRs are essential in pathogen recognition during the innate response. Thus, these results suggest that FcR-mediated signals can be deeply influenced by the type of pathogen being recognized, are of great relevance.

### Final considerations

FcRs constitute an important link between Ab immune responses and leukocyte effector functions. Through the FcRs, targets recognized with the exquisite specificity of Abs generated by cells of the adaptive immune system can be internalized and destroyed by cells of the innate immune response. Ligand-induced crosslinking of FcRs is known to be sufficient for triggering the biochemical cascade that mediates cellular activation. However, an effector function determined solely by FcR aggregation on the cell membrane is probably an oversimplified view of

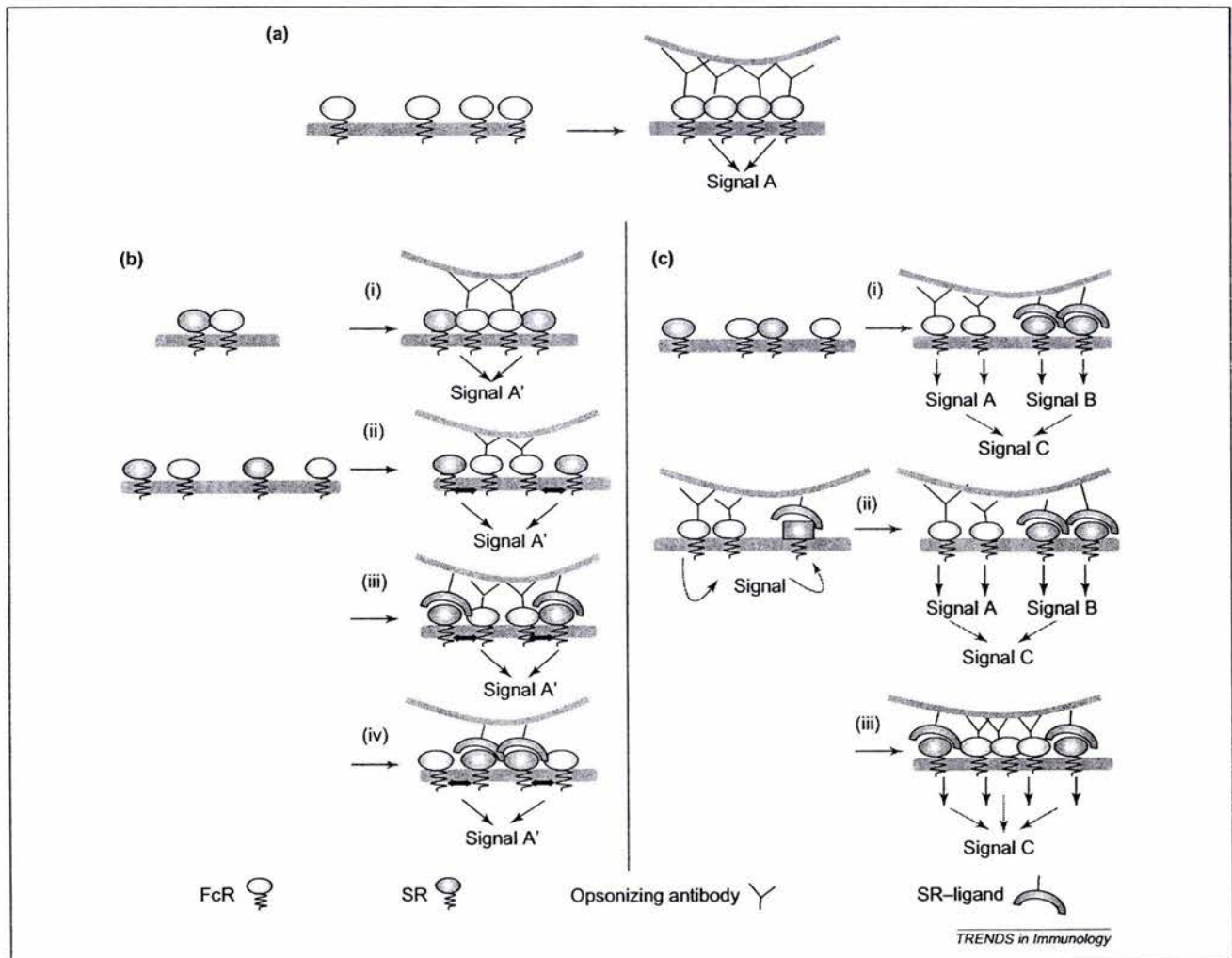
their function *in vivo*. Because there is ample evidence of the intricate interplay between activatory and inhibitory signals in the modulation of the activation of other effector cells, such as cytolytic T cells and natural killer (NK) cells, it should not be surprising that FcR-mediated leukocyte activation is also sensitive to modulation by simultaneous ligation of other membrane molecules, which interact with as yet undefined structures in bacteria or other pathogens.

In this Review, we have summarized observations suggesting a putative role of various leukocyte membrane molecules in the modulation of FcR-mediated functions. In most cases, the effect was observed in the biochemical responses after simultaneously ligating FcRs and other membrane molecules by specific mAbs. Co-ligation of FcRs and SRs by mAbs mimics simultaneous engagement of both molecules by their natural ligands. It should be

noted, however, that for many of the SRs mentioned earlier, natural ligands are yet to be identified. Besides, it is not uncommon in immunology to discover functions of membrane molecules by the effect of mAbs on the response of the cell.

The mechanisms mediating the modulatory effects are unknown, except for ITIM-containing molecules, whose inhibitory function can be reasonably assumed to be similar to that mediated by the ITIM-containing Fc $\gamma$ RIIB RIIIB isoforms. Possible mechanisms operating in the modulation of FcR function by other molecules are illustrated in Figure 2.

*In vitro*, many of the FcR-mediated effector functions can proceed by crosslinking of FcRs induced by heavily opsonized particles or by antigen-Ab complexes formed *in vitro* under optimized conditions. However, *in vivo*, there could be situations in which sub-optimal levels of



**Figure 2.** Possible mechanisms of modulation of FcR-mediated signaling by signal regulators (SRs). (a) In the absence of a SR, FcR cross-linking induces signal (i). (b) A SR without intrinsic signaling capacity (e.g. tetraspanins). (i) Constitutive association between FcR and SR. FcR-aggregation induces passive co-aggregation of SR, generating a modulated signal A'. (ii) FcR cross-linking induces co-aggregation of SR in the absence of SR ligand. FcR-SR complexes induce modulated signal A'. (iii) The opsonized particle contains a SR ligand, thus inducing co-aggregation of receptor and SR and generation of modulated signal A'. (iv) Binding of the SR to its ligand induces co-aggregation of the receptor in the absence of opsonizing antibody. SR uses the signaling machinery of FcR to produce a signal A'. (c) SR with signaling capacity [e.g. Siglecs, signal regulatory proteins (SIRPs), Ig-like transcripts (ILTs)]. (i) Individual but simultaneous binding of FcR and SR to their ligands. Intersection of individual signals A and B generates modulated signal C (e.g. SIRP-CD47). (ii) FcR-aggregation induces an inside-out signal that changes the affinity and/or activity of SR. The SR triggered signal intersects with FcR-induced one generating a signal C. (iii) Interaction of both FcR and SR to their correspondent ligands stabilizes the FcR-target interaction resulting in a modulated signal C.

FcR crosslinking must evoke cell activation. It is in these cases that signal regulation might be of great relevance for defining the activation or inhibition of an effector response. Establishing the modulation of FcR-mediated effector functions by other membrane molecules when leukocytes are stimulated by more 'physiological' stimuli is essential for defining if the observed effects mediated by mAbs recognizing membrane antigens are artifacts of the experimental systems or if, in fact, mAbs are mimicking *in vivo* situations more closely.

Moreover, in the case of the family of leukocyte receptors for IgG, unraveling the possible modulation of Fc $\gamma$ R-mediated effector functions by signal regulators could be essential for understanding the biological significance of the heterogeneity of this family of receptors. It is possible that distinct Fc $\gamma$ R isoforms, despite being able to interact with the same isotypes of IgG Abs and to mediate the same effector functions, could have differential sensitivity to modulation by other molecules. If this is the case, the expression of more than one Fc $\gamma$ R isoform in a given cell type might be essential for assuring its optimal response in different situations. Only when we get to understand the complexity of Ig-mediated leukocyte effector functions, will we be able to effectively use this knowledge for therapeutic interventions.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from UNAM (IN213701) and CONACYT (31783-N).

#### References

- Daëron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203–234
- Ravetch, J. and Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275–290
- Keegan, A.D. and Paul, W.E. (1992) Multichain immune recognition receptors. *Immunol. Today* 13, 63–68
- Ortiz-Stern, A. and Rosales, C. (2003) Cross-talk between Fc receptors and integrins. *Immunol. Lett.* 90, 137–143
- Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1189–1205
- Maecker, H.T. et al. (1997) The tetraspanin superfamily, molecular facilitators. *FASEB J.* 11, 428–442
- Hemler, M. (2001) Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155, 1103–1107
- Worthington, R.E. et al. (1990) Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc $\gamma$ II receptor. *Br. J. Haematol.* 74, 216–222
- Slupsky, J. et al. (1992) Role of Fc $\gamma$ RII in platelet activation by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 148, 3189–3194
- Bachelot, C. et al. (1995) Role of Fc $\gamma$ RIIA gene polymorphism in human platelet activation by monoclonal antibodies. *Thromb. Haemost.* 74, 1557–1563
- Kuroda, K. et al. (1995) Fc $\gamma$ RII receptor-mediated platelet activation induced by anti-CD9 monoclonal antibody opens Ca<sup>2+</sup> channels which are distinct from those associated with Ca<sup>2+</sup> store depletion. *J. Immunol.* 155, 4427–4436
- Qi, R. et al. (1996) Differential activation of human platelets induced by Fc $\gamma$  receptor II cross-linking and by anti-CD9 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 157, 5638–5645
- Nagata, H. et al. (1990) A new monoclonal CD9 antibody, MALL13, induces platelet activation and cytolysis. *Acta Haematol.* 53, 1156–1171
- Render, F. et al. (1987) Mechanism of the mAb ALB6 (CD9) induced human platelet activation, comparison with thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 1397–1404
- Kaji, K. et al. (2001) Functional association of CD9 with the Fc $\gamma$  receptors in macrophages. *J. Immunol.* 166, 3256–3265
- Higginbottom, A. et al. (2000) Antibody cross-linking of human CD9 and the high affinity immunoglobulin E receptor stimulates secretion from transfected rat basophilic leukaemia cells. *Immunology* 99, 546–552
- Roberts, J.J. et al. (1995) Platelet activation induced by a murine monoclonal antibody directed against a novel tetra-span antigen. *Br. J. Haematol.* 89, 853–860
- Gil, M. et al. (1992) A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. *J. Immunol.* 148, 2826–2833
- Imai, T. et al. (1992) C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J. Immunol.* 149, 2879–2886
- Nojima, Y. et al. (1993) The 4F9 antigen is a member of the tetra spans transmembrane protein family and functions as an accessory molecule in T cell activation and adhesion. *Cell. Immunol.* 152, 249–260
- Lebel-Binay, S. et al. (1994) Further characterization of CD82/IA4 (Type III Surface protein), an activation/differentiation marker of mononuclear cells. *Cell. Immunol.* 154, 468–483
- Lebel-Binay, S. et al. (1995) CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.* 57, 956–963
- Fearon, D. and Carter, R. (1995) The CD19–CR2–TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 127–149
- Deng, J. et al. (2002) Critical role of CD81 in cognate T–B cell interactions leading to Th2 responses. *Int. Immunol.* 14, 513–523
- Oren, R. et al. (1990) TAPA-1 the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4007–4015
- Fleming, T.J. et al. (1997) Negative regulation of Fc $\epsilon$ RI-mediated degranulation by CD81. *J. Exp. Med.* 186, 1307–1314
- Poe, J.C. et al. (2001) CD19, CD21, and CD22, multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Int. Rev. Immunol.* 20, 739–762
- Ulyanova, T. et al. (1999) The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.* 29, 3440–3449
- Paul, S. et al. (2000) Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96, 483–490
- Braesch-Andersen, S. and Stamenkovic, I. (1994) Sialylation of the B lymphocyte molecule CD22 by  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase is implicated in the regulation of CD22-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 269, 11783–11786
- Varki, A. (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* 11, 248–255
- Crocker, P. and Varki, A. (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* 22, 337–342
- Dietrich, J. et al. (2000) Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells. *Microbes Infect.* 2, 323–329
- Cella, M. et al. (1997) A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J. Exp. Med.* 185, 1743–1751
- Colonna, M. et al. (1998) Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J. Immunol.* 160, 3096–3100
- Colonna, M. et al. (1997) A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186, 1809–1818
- Nakajima, H. et al. (1999) Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor  $\gamma$ -chain. *J. Immunol.* 162, 5–8
- Maeda, A. et al. (1998) Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor  $\gamma$  chain. *J. Exp. Med.* 188, 991–995

- 39 Liénard, H. *et al.* (1999) Signal regulatory proteins negatively regulate immunoreceptor-dependent cell activation. *J. Biol. Chem.* 274, 32493–32499
- 40 Oldenburg, P.A. *et al.* (2001) CD47-signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) regulates Fc $\gamma$  and complement receptor-mediated phagocytosis. *J. Exp. Med.* 193, 855–861
- 41 Macintyre, E. *et al.* (1989) Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. *J. Immunol.* 142, 2377–2383
- 42 Aiken, M. *et al.* (1990) Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 76, 2501–2509
- 43 Rubinstein, E. *et al.* (1991) Fc $\gamma$  receptor-mediated interplatelet activation by a monoclonal antibody against  $\beta$ 2 microglobulin. *J. Immunol.* 147, 3040–3046
- 44 Anderson, G.P. *et al.* (1991) Anti-GPIIb/IIIa (CD41) monoclonal antibody-induced platelet activation requires Fc receptor-dependent cell-cell interaction. *Br. J. Haematol.* 79, 75–83
- 45 Rubinstein, E. *et al.* (1992) Platelet activation by cross-linking HLA class I molecules and Fc receptor. *Blood* 79, 2901–2908
- 46 Horsewood, P. *et al.* (1991) Investigation of the mechanisms of monoclonal antibody-induced platelet activation. *Blood* 78, 1019–1026
- 47 Taylor, S.M. *et al.* (2000) Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human Fc $\gamma$ RIIA transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor. *Blood* 96, 4254–4260
- 48 McKenzie, S. (2002) Humanized mouse models of FcR clearance in immune platelet disorders. *Blood Rev.* 16, 3–5
- 49 Ortega, E. *et al.* (1991) Possible interactions between the Fc $\epsilon$  receptor and a novel mast cell function-associated antigen. *Int. Immunol.* 3, 333–342
- 50 Ozinsky, A. *et al.* (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13766–13771
- 51 Boulé, M. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.* (in press)

## Endeavour

the quarterly magazine for the history  
and philosophy of science

You can access *Endeavour* online via  
*ScienceDirect*, where you'll find a  
collection of beautifully illustrated  
articles on the history of science, book  
reviews and editorial comment.

Featuring

Sverre Pettersen and the Contentious (and Momentous) Weather Forecasts for D-Day, 6 June 1944 by J.R. Fleming  
Food of Paradise: Tahitian breadfruit and the Autocritique of European Consumption by P. White and E.C. Spary  
Two Approaches to Etiology: The Debate Over Smoking and Lung Cancer in the 1950s by M. Parascandola  
Sicily, or sea of tranquility? Mapping and naming the moon by J. Vertesi  
The Prehistory of the Periodic Table by D. Rouvray  
Two portraits of Edmond Halley by P. Fara

and coming soon

Fighting the 'microbe of sporting mania': Australian science and Antarctic exploration in the early twentieth century  
by P. Roberts  
Learning from Education to Communicate Science as a Good Story by A. Negrete and C. Lartigue  
The Traffic and Display of Body Parts in the Early-19th Century by S. Alberti and S. Chaplin  
The Rise, Fall and Resurrection of Group Selection by M. Borrello  
Pomet's great "Compleat History of Drugs" by S. Sherman  
Sherlock Holmes: scientific detective by L. Snyder  
The Future of Electricity in 1892 by G.J.N. Gooday  
The First Personal Computer by J. November  
Balloonmania: news in the air by M.G. Kim

and much, much more . . .

Locate *Endeavour* on *ScienceDirect* (<http://www.sciencedirect.com>)

# Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with Fc $\gamma$ Rs in human monocytes

Paola Mina-Osorio and Enrique Ortega<sup>1</sup>

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

**Abstract:** Aminopeptidase N (E.C. 3.4.11.2) is a membrane-bound metalloproteinase expressed in many tissues. Although its cytoplasmic portion has only eight amino acids, cross-linking of CD13 by monoclonal antibodies (mAb) has been shown to trigger intracellular signaling. A functional association between CD13 and receptors for immunoglobulin G (Fc $\gamma$ Rs) has been proposed. In this work, we evaluated possible functional interactions between CD13 and Fc $\gamma$ Rs in human peripheral blood monocytes and in U-937 promonocytic cells. Our results show that during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis, CD13 redistributes to the phagocytic cup and is internalized into the phagosomes. Moreover, modified erythrocytes that interact with the monocytic cell membrane through Fc $\gamma$ RI and CD13 are ingested simultaneously, more efficiently than those that interact through the Fc $\gamma$ RI only. Also, co-cross-linking of CD13 with Fc $\gamma$ RI by specific mAbs increases the level and duration of Syk phosphorylation induced by Fc $\gamma$ RI cross-linking. Finally, Fc $\gamma$ RI and CD13 colocalize in zones of cellular polarization and coredistribute after aggregation of either of them. These results demonstrate that CD13 and Fc $\gamma$ RI can functionally interact on the monocytic cell membrane and suggest that CD13 may act as a signal regulator of Fc $\gamma$ R function. *J. Leukoc. Biol.* 77: 1008–1017; 2005.

**Key Words:** Fc receptors · macrophages · phagocytosis

## INTRODUCTION

Receptors for the Fc portion of immunoglobulin G (IgG; Fc $\gamma$ Rs) are glycoproteins that belong to the family of multichain immune recognition receptors (MIRRs) and are expressed on the vast majority of leukocytes. Three distinct types of classic Fc $\gamma$ Rs have been described: one with high-affinity for Fc $\gamma$ RI and two low-affinity receptors, Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII [1, 2]. Cross-linking of Fc $\gamma$ Rs by IgG-opsonized particles or IgG-containing immunocomplexes triggers an intracellular cascade of biochemical events that leads to a variety of important cellular functions such as phagocytosis, immune regulation, cytolysis, and transcriptional activation of cytokine-encoding genes, which initiate inflammatory responses related to protection against bacterial infection, autoimmunity, and hypersensitivity [3–7].

Cell activation mediated by other MIRRs, such as the B cell receptor (BCR) and the T cell receptor (TCR), is modulated by costimulatory and inhibitory molecules [8]. Similarly, several studies suggest that signaling induced by activatory Fc $\gamma$ Rs is susceptible to modulation by other membrane proteins (signal regulators) such as tetraspanins, signal regulatory proteins, and siglecs (sialic acid-binding lectins) [9], although the biological significance of these phenomena has not been explored in detail.

CD13 (aminopeptidase N) is an ectoenzyme (E.C.3.4.11.2) of the superfamily of zinc metalloproteases [10] expressed in many tissues including kidney, intestine, liver, placenta, and the nervous system [11]. In the hematopoietic system, CD13 is expressed on stem cells and during most developmental stages of myeloid cells [12], and for this reason, it is widely used as a marker of myelomonocytic cells in the diagnosis of hematopoietic malignant disorders. Furthermore, CD13 participates in angiogenesis regulation [13], cellular motility, and dendritic cell (DC)-induced T cell activation [14]. CD13 is also a receptor for human coronavirus 229E and other enteropathogenic coronaviruses [15] and participates in human cytomegalovirus infection [16, 17]. Moreover, the possibility of CD13 being a receptor for the coronavirus responsible for the severe acute respiratory syndrome has been suggested recently [18]. Because of its ectopeptidase activity, CD13 has been implicated in the regulation of vasoactive peptides, neuropeptide hormones, and immunomodulating peptides such as interleukin-6 and -8 (IL-6 and IL-8, respectively) [19–22].

A role for CD13 as a signal-transducing molecule in monocytes has been reported [23, 24], although it has a short cytosolic domain of eight amino acid residues containing no known signaling motifs [25]. This observation has led to the suggestion that signal transduction by CD13 requires the participation of an auxiliary membrane protein of still-unknown identity.

Cooperation between CD13 and Fc $\gamma$ Rs was first suggested when McIntyre et al. [24] in 1989 proposed that the Ca<sup>++</sup> increase induced by anti-CD13 monoclonal antibodies (mAb) in the human monocytic cell line U-937 could result from mAb-induced formation of membrane complexes between the antigen (CD13) and the Fc $\gamma$ Rs. The involvement of Fc $\gamma$ Rs in

<sup>1</sup> Correspondence: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Escolar, S/N Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510 México. E-mail: ortoto@servidor.unam.mx

Received December 9, 2004; revised January 26, 2005; accepted February 11, 2005; doi: 10.1189/jlb.1204714.

CD13-mediated signaling was deduced from two observations: the effect could not be reproduced using F(ab)<sub>2</sub> fragments of the antibody, and the magnitude of this effect varied according to the isotype of the anti-CD13 antibody tested [24]. However, the conclusion that CD13 signals through FcγRs has been challenged by the observation that inhibition of the enzymatic activity of CD13, which in principle would not alter the formation of the CD13-FcγR complexes, blocks the CD13-mediated signal, although other reports showed that enzymatic activity is not required for CD13-mediated signaling [26, 27].

In 1996, Tokuda and Levy [28] found a correlation between CD13 expression and phagocytosis of carboxyl microspheres. They noticed that the most actively phagocytic cells in the monocytic gate of peripheral blood mononuclear cells expressed higher levels of CD13 (more than twice the level) than less phagocytic cells. Moreover, they showed that induction of differentiation of these cells with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, which increases the phagocytic capacity of monocytes, diminishes CD13 expression in cells with low, but not in those with high, phagocytic capacity, suggesting a role for CD13 in phagocytosis [28].

In this work, we evaluated the possible functional association between FcγRs and CD13 using several approaches. Our results lead us to propose CD13 as a signal regulator of FcγRI-mediated signal transduction.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and antibodies

The promonocytic cell line U-937 [obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC), Rockville, MD] was cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Grand Island, NY), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM MEM nonessential amino acid solution, 0.1 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Murine monoclonal anti-human FcγRI (32.2) was purified from supernatants of the corresponding hybridoma obtained from the ATCC and was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) by standard procedures. Murine monoclonal anti-human CD13 (clone 452, IgG1) was purified in our laboratory from the culture supernatant of the hybridoma, kindly donated by Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA). F(ab)<sub>2</sub> fragments of the antibodies were prepared with immobilized ficin (Pierce, Rockford, IL). Texas Red<sup>®</sup>-X succinimidyl ester (TR) was from Molecular Probes (Eugene, OR). Monoclonal anti-human CD13 (clone WM47, IgG1) was from Sigma Chemical Co. Monoclonal anti-human CD82 was from BD Pharmingen (San Diego, CA). Monoclonal anti-human CD33 (P67.6) was from Santa Cruz Biotechnology (CA). Antiphosphotyrosine antibodies (PY20 and PY99) and polyclonal anti-Syk (N-19) were from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal dinitrophenyl (DNP)-specific antibody 3B5 (IgG<sub>2b</sub>), used as opsonizing antibody in the confocal microscopy phagocytosis assay, was purified from culture supernatant of the correspondent hybridoma and conjugated with FITC. Goat anti-mouse IgG-FITC, goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP), streptavidin-TR, and biotinylated F(ab)<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG were from Zymed (San Francisco, CA). F(ab)<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG and F(ab)<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG conjugated with TR were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

### Human peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages

Normal human peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation of buffy coats from healthy donors using Ficoll-Paque

Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), as described previously [29], washed four times, and cultured for 45 min at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 5% autologous plasma-derived serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM MEM nonessential amino acid solution, 0.1 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin, allowing monocytes to adhere to plastic. Nonadherent cells were eliminated by several washes, and adherent cells enriched for monocytes (more than 95% purity as determined by flow cytometry using CD14 and CD33 as markers of the monocytic population) were cultured for 48 h in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and finally harvested by mechanical scraping for further experimentation. Monocyte-derived macrophages were obtained after culturing adherent cells for 6 days in the presence of 5% autologous plasma-derived serum as described [29, 30].

### Phagocytosis by laser-scanning confocal microscopy (LSCM)

Sheep red blood cells (SRBC) were washed in 2.5% dextrose, 0.05% gelatin, 2.5 mM veronal, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.15 mM CaCl<sub>2</sub> (DGVB<sup>2+</sup>) and sensitized with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid sodium salt in borate buffer (boric acid 200 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) for 10 min at room temperature (RT) and then washed twice with DGVB<sup>2+</sup> and once with serum-free RPMI medium. Opsonization of SRBC was achieved by incubation of a suspension of sensitized SRBC with a subhemagglutinating concentration of anti-DNP-FITC-labeled 3B5 mAb (IgG2b) or anti-DNP-nonlabeled 4F8 mAb (IgG2b) for 60 min at RT. Unbound antibodies were removed by washing. For the phagocytosis assay, the opsonized fluorescent erythrocytes were incubated for different times at 37°C with monocytes or U-937 cells in supplemented RPMI medium in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Simultaneously, monocytes or U-937 cells were incubated with nonopsonized erythrocytes or erythrocytes opsonized with non-fluorescent IgG under the same conditions. The cells were then washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and where indicated, fixed in 1% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, incubated on ice with TR-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-CD13 mAb, pelleted, and mounted on microscopy slides [mounting medium 50% PBS/glycerol v/v, 0.1% 1,4-diazabicyclo (2.2.2) octane (DABCO)] for analysis on a Zeiss LSM 510 confocal microscope. In other samples, biotinylated F(ab)<sub>2</sub> fragments of the anti-CD13 antibody were added and incubated for 30 min. After two more washes, TR-conjugated streptavidin (TR-streptavidin, Zymed) was added to the cell suspension for 20 min, and cells were pelleted and mounted as above. X-Y slices of every image were generated. Only an appropriate X-Y slice of each image is presented. Where indicated, noninternalized erythrocytes were lysed by hypotonic shock before CD13 staining. Incubation with streptavidin-TR alone led to negligible staining.

### CD13/FcγRI-specific phagocytosis

Modified SRBC were prepared as described previously [31] with some modifications. Briefly, erythrocytes (at 1 × 10<sup>9</sup>/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 8.6) were incubated with 125 μg/ml sulfosuccinimidobiotin (Pierce) for 20 min at 4°C. Next, they were coated with streptavidin (125 μg/ml, Calbiochem, San Diego, CA) for 30 min at 4°C. The biotin-streptavidin-coated erythrocytes were washed and incubated with biotinylated F(ab)<sub>2</sub> fragments of goat anti-mouse IgG (Zymed) for 30 min [SRBCs coated with biotin, streptavidin, and F(ab)<sub>2</sub> fragments of biotinylated anti-IgG antibodies (EBS-Ab)].

For the phagocytosis assay, monocytes, monocyte-derived macrophages, or U-937 cells were incubated with the indicated concentrations of complete or F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-FcγRI mAb, anti-CD13 mAb, or both, washed, and mixed with erythrocytes at a ratio of one monocytic cell:25–50 EBS-Ab at 37°C for 20–30 min in the case of peripheral blood monocytes and for 90 min with U-937 cells. Finally, after lysis of noninternalized erythrocytes by hypotonic shock, phagocytosis was quantified by light microscopy. Data are expressed as phagocytic indexes (the number of ingested erythrocytes/100 phagocytic cells). Statistical analysis was performed using a paired *t*-test with a significance level of 0.05.

### Cell stimulation and immunoblotting

Cell suspensions (3 × 10<sup>6</sup> cells/300 μl) were incubated for 10 min on ice in serum-free RPMI 1640 with primary antibodies (10 μg each anti-FcγRI, anti-FcγRI and anti-CD13, or anti-CD13 alone). After a brief centrifugation at



1000 r.p.m., the supernatant was discarded, the cells were resuspended in fresh serum-free medium, and 20  $\mu\text{g}$  F(ab)<sub>2</sub> fragments of secondary antibody were added for the indicated periods of time at 37°C. Stimulation was stopped by placing tubes on ice and adding 150  $\mu\text{l}$  ice-cold Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5). The cells were pelleted by a brief centrifugation, resuspended in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, glycerol 5%, Triton X-100 1%, pH 7.5) with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM NaF, and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  each aprotinin, leupeptin, pepstatin A, and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and kept on ice for 15 min. Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 r.p.m. at 4°C for 15 min. Protein quantification was made using the DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Aliquots of the lysates were boiled in Laemmli sample buffer, separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) using a semi-dry Trans-blot apparatus (Bio-Rad). Membranes were blocked in 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS containing 0.05% Tween 20 overnight at 4°C. After washing, tyrosine phosphorylated proteins were detected with a mixture of two antiphosphotyrosine antibodies (PY20 and PY99) in 3% BSA and a secondary HRP-conjugated antibody. Chemiluminescent signal was detected using Super Signal enhanced chemiluminescence kit (Pierce), according to the manufacturer's instructions in a Fluor-S Multi-imager (Bio-Rad). Densitometry was performed using the Quantity One software (Bio-Rad). Membranes were stripped with 0.1 M glycine (pH 2.5), blocked for 1 h, and reblotted with anti-Syk antibody, followed by HRP-conjugated secondary antibody. Detection was made as described above.

## Colocalization and core distribution assays by LSCM

For colocalization studies, peripheral blood monocytes or U-937 cells ( $2.5 \times 10^7/300 \mu\text{l}$ ) were fixed in 1% PFA for 20 min on ice, washed, and subsequently incubated on ice for 15 min in PBS with 5% fetal calf serum and 0.1% sodium azide. F(ab)<sub>2</sub> fragments of primary antibody (anti-Fc $\gamma$ RI) were added (10  $\mu\text{g}$ ) for 30 min at 4°C. The cells were washed and then incubated with F(ab)<sub>2</sub> fragments of a secondary FITC-labeled antibody (1:300 dilution) for 30 min at 4°C. After washing, biotinylated F(ab)<sub>2</sub> fragments of the anti-CD13 mAb were added for 30 min on ice and detected with streptavidin-TR for 30 min at 4°C. Finally, cells were washed and mounted in PBS/glycerol/DABCO as described above for analysis by LSCM. In other experiments, TR-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-CD13 mAb were used.

For core distribution experiments, monocytes or U-937 cells were incubated with anti-Fc $\gamma$ RI mAb for 30 min at 4°C. After washing, they were incubated with F(ab)<sub>2</sub> fragments of a secondary FITC-labeled antibody for 20 min at 4°C and then at 37°C for different periods of time to allow the receptor's aggregation. After washing and fixing in 1% PFA for 20 min on ice, CD13 was detected as above in the presence of 0.1% sodium azide, and cells were mounted for analysis by LSCM. The opposite experiment was conducted, inducing aggregation of CD13 with TR-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of the 452 mAb, followed by F(ab)<sub>2</sub> fragments of a secondary, nonlabeled antibody. After cell fixation at 4°C, Fc $\gamma$ RI was detected with FITC-labeled, anti-Fc $\gamma$ RI mAb.

## RESULTS

### CD13 redistributes to the zones of Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis and is internalized into the phagosomes

Changes in the cellular distribution of CD13 associated with Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis were evaluated by confocal microscopy. Peripheral blood monocytes or U-937 cells were incubated with erythrocytes opsonized with FITC-labeled IgG for different periods of time. These opsonized erythrocytes aggregate both types of Fc $\gamma$ Rs expressed on the monocytic cell membrane (i.e., Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII). To visualize CD13 at different stages of the process, we stopped phagocytosis by transferring the assay tubes into ice or fixing cells with 1% PFA at 4°C. At this temperature, they were incubated with

TR-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-CD13 mAb for 30 min or alternatively, with biotinylated F(ab)<sub>2</sub> fragments of the antibody and subsequently, with TR-streptavidin. **Figure 1A** shows distribution of CD13 on the U-937 cell membrane before phagocytosis. After 60 min of incubation at 37°C, a clear redistribution of CD13 to the zones of contact with opsonized erythrocytes was seen (**Fig. 1, B–D**). In the initial steps of phagocytosis (**Fig. 1, E–H**), CD13 was concentrated in the zones of the membrane starting to internalize the erythrocytes (**Fig. 1E**, white arrows), seen in yellow in the projection (**Fig. 1H**). Green fluorescence outside of the two visible erythrocytes (**Fig. 1, G and H**) corresponds to other erythrocytes barely visible at this plane of slicing. **Figure 1H** corresponds to a single projection obtained by rotating the data of the original image around the *x*-axis. In this image, it is evident that colocalization of Fc $\gamma$ RI and CD13 is restricted to the zones of contact between the membranes of erythrocytes and that of the U-937 cell.

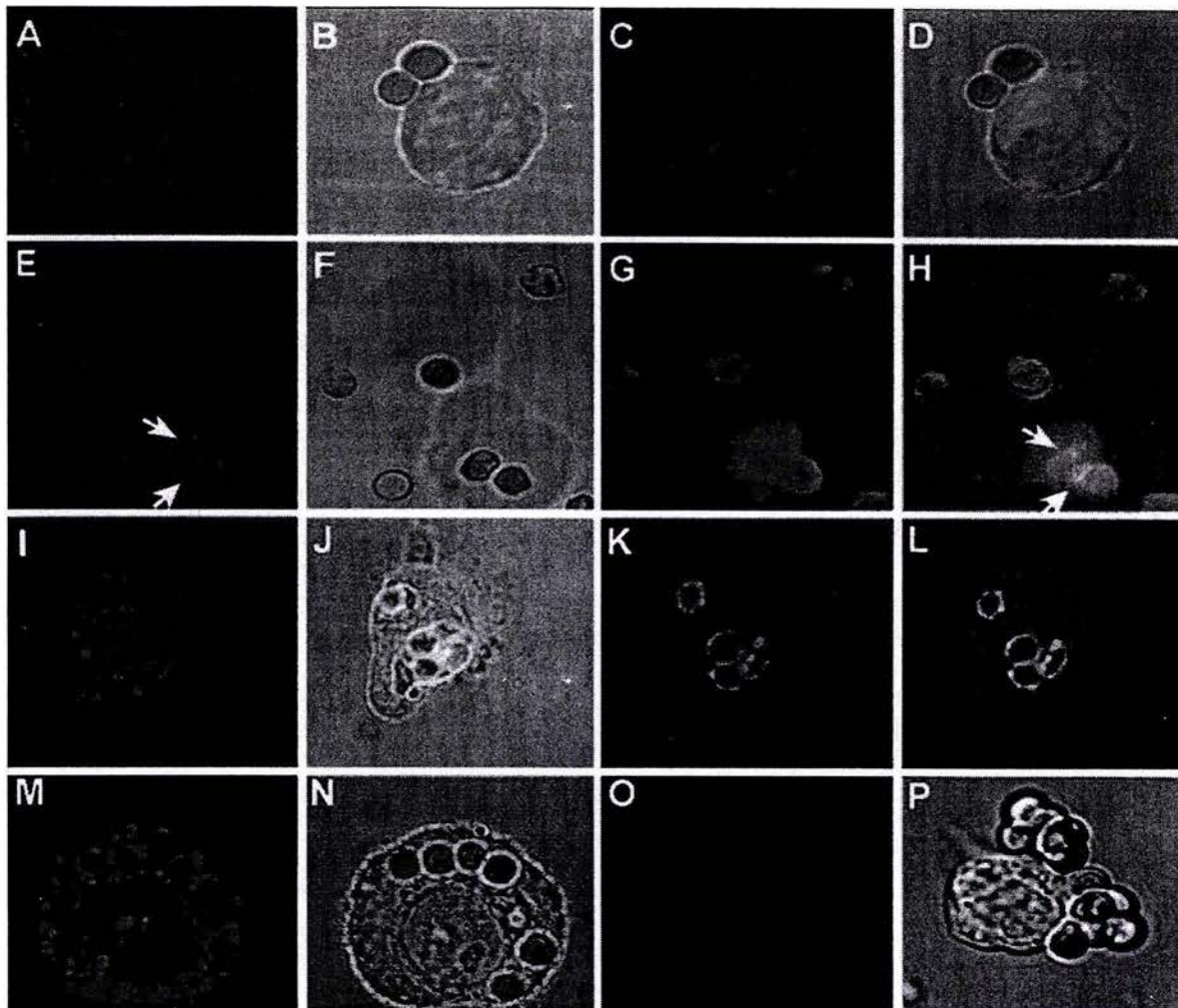
Moreover, in samples in which U-937 cells were preincubated with TR-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of the mAb and then incubated with IgG-FITC-opsonized erythrocytes for longer periods of time (90 min) to allow complete internalization, phagosomes appeared entirely surrounded by CD13 (**Fig. 1, I–L**). Internalization of CD13 into phagosomes was also observed when the erythrocytes were opsonized with nonfluorescent IgG (**Fig. 1, M–O**), in which case, no green fluorescence was detected in the corresponding channel (**Fig. 1, O**) under the instrument settings used to detect a bright red fluorescence, ruling out the possibility of a bleed-through-originated signal. In cells incubated with opsonized erythrocytes at 4°C, no redistribution of CD13 to the zones of contact was detected (**Fig. 1P**).

In peripheral blood monocytes, which internalized IgG-opsonized erythrocytes more efficiently than U-937 cells, the same redistribution phenomenon was seen (**Fig. 2**). As can be noted in **Figure 2, A and B**, distribution of the CD13 label in the phagosomes can be visualized as a uniform red staining or as a ring surrounding the internalized erythrocyte, depending on the plane of the X-Y slice. **Figure 2, C and D**, shows monocytes after 30 min of incubation with IgG-opsonized erythrocytes at 37°C, showing most of the CD13 initially expressed on the cell membrane, now internalized in the phagosomes.

After internalization of erythrocytes in U-937 cells and primary monocytes, red fluorescent signals were detected in periphagosomal and perinuclear areas in the cytoplasm, as shown in **Figures 1M and 2A**.

### Coaggregation of Fc $\gamma$ RI and CD13 increases the Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytic capacity of monocytic cells

To analyze in detail the functional implications of CD13 redistribution during phagocytosis, we focused on the activatory, high-affinity Fc $\gamma$ RI, as this receptor, in contrast to Fc $\gamma$ RII, does not have inhibitory isoforms that could obscure the effect of CD13 on Fc $\gamma$ R-mediated signaling. Thus, we compared the phagocytic index when SRBC, coated with biotin, streptavidin, and F(ab)<sub>2</sub> fragments of biotinylated anti-IgG antibody (EBS-Ab), bound to the monocytic or U-937 cell through the Fc $\gamma$ RI



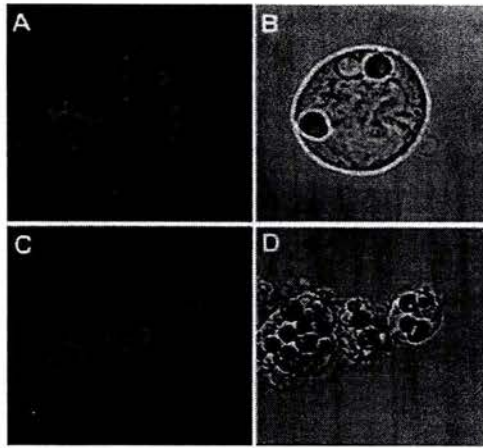
**Fig. 1.** CD13 redistributes to the phagocytic cup during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in U-937 cells. (A) CD13 distribution on resting cells. (B–D) U-937 cells were incubated with IgG-opsonized erythrocytes for 60 min at 37°C. Cells were fixed, and CD13 was detected by incubation with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of mAb anti-CD13. (D) Redistributed CD13 in the zone of contact with erythrocytes. (E–H) U-937 cells were incubated with FITC-IgG-opsonized erythrocytes for 60 min at 37°C. Cells were chilled, and CD13 was detected by incubation with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of mAb anti-CD13. CD13 is visualized in the zones of the membrane in contact with erythrocytes (E, white arrows). Cell membranes are out of focus (see transmitted light, F), impeding detection of distribution of the rest of the population of CD13 molecules in this slice. Erythrocytes are fluorescent in the green channel (G). (H) Projection shows in yellow sites of colocalization of Fc $\gamma$ R (IgG-opsonized erythrocytes) and CD13 (arrows). (I–L) U-937 cells were incubated with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb at 4°C before phagocytosis, washed, and incubated with FITC-IgG-opsonized erythrocytes for 90 min at 37°C. Noninternalized erythrocytes were lysed before observation in the confocal microscope. Erythrocytes internalized into phagosomes (J, K) are surrounded by CD13 (I). (J and L) Colocalization of the CD13-red signal with FITC-IgG-labeled erythrocytes in the phagosomes. (M–O) Similar experiment as that shown in I–L but with erythrocytes opsonized with nonlabeled IgG. CD13 is seen inside the phagosomes (M). No fluorescence is seen in the green channel (O). (P) Transmitted light and red channel-composed image of U-937 cells incubated with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb before incubation with IgG-opsonized erythrocytes for 60 min at 4°C. CD13 does not redistribute to zones of contact with erythrocytes.

alone, through the Fc $\gamma$ RI and CD13 together, or through CD13 alone.

In peripheral blood monocytes and U-937 cells, Fc $\gamma$ RI alone was able to mediate phagocytosis of EBS-Ab. However, when EBS-Ab interacted with U-937 cells through Fc $\gamma$ RI and CD13 (10  $\mu$ g each mAb), phagocytosis was 220% higher ( $n=6$ ) than that mediated by Fc $\gamma$ RI alone (Fig. 3A). Similar results were obtained using two different anti-CD13 mAb—the 452 mAb and the WM47 mAb (data not shown)—and using intact antibody or its F(ab) $'_2$  fragments. EBS-Ab, interacting through Fc $\gamma$ RI and CD82, which is another highly expressed molecule in U-937 cells that has also been reported to possibly cooperate

with Fc $\gamma$ Rs [32], did not induce statistically significant changes in the phagocytic index even when mAb anti-CD82 was used as complete antibody (Fig. 3A).

In peripheral blood monocytes, EBS-Ab that interacted through CD13 and Fc $\gamma$ RI, were also internalized more efficiently than those that bound through Fc $\gamma$ RI alone (Fig. 3B). At concentrations of 10  $\mu$ g of each antibody, the phagocytic index was 48.41% higher than that observed with Fc $\gamma$ RI alone ( $n=11$ ). Although cells from different donors showed large differences in phagocytic capacity, it was clear that in cells from all donors examined, the effect of co-engagement of CD13 and Fc $\gamma$ RI was observed (Fig. 3C).



**Fig. 2.** CD13 redistributes to the phagocytic cup during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in peripheral blood human monocytes. (A, B) Human monocytes were incubated with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb at 4°C before phagocytosis, washed, and incubated with IgG-opsonized erythrocytes for 15 min at 37°C. Noninternalized erythrocytes were lysed before observation in the confocal microscope. Erythrocytes internalized in phagosomes are surrounded by CD13. Distribution of CD13 label in the phagosomes is visualized as a uniform red staining in one phagosome and as a ring surrounding the other two internalized erythrocytes as a result of the plane of the X-Y slice. (C, D) After 30 min, phagosomes show internalized CD13.

It is surprising that anti-CD13 mAb tested triggered EBS-Ab internalization with a phagocytic index similar to that observed through Fc $\gamma$ RI alone, using complete antibody or its F(ab) $'_2$  fragments. To determine the specificity of this CD13-mediated phagocytosis, we preincubated cells with a mAb specific for CD33, another highly expressed molecule in U-937 cells, or with an unrelated IgG1 mAb (anti-DNP), and both conditions resulted in phagocytic indexes not significantly different from those obtained when the cells were incubated without antibodies (Fig. 3A), although as expected, EBS-Ab bound to cells preincubated with the anti-CD33 mAb. Furthermore, CD13-mediated phagocytosis of EBS-Ab depended on the amount of anti-CD13 mAb bound to monocytes (Fig. 3D).

The effect of co-engaging CD13 on Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis was even higher in monocyte-derived macrophages obtained after culturing blood monocytes for 6 days (Fig. 4A). In these cells, CD13 alone also mediates phagocytosis (Fig. 4, A and B, ■). Figure 4B shows the relative phagocytic index (ratio of the phagocytic index of Fc $\gamma$ RI-CD13 to that of Fc $\gamma$ RI alone at the corresponding dose of anti-Fc $\gamma$ RI mAb). The maximal increase (250%) was observed with 2  $\mu$ g anti-Fc $\gamma$ RI and 10  $\mu$ g F(ab) $'_2$  fragments of the anti-CD13 mAb compared with 2  $\mu$ g of anti-Fc $\gamma$ RI alone.

### Co-cross-linking of Fc $\gamma$ RI and CD13 prolongs Syk phosphorylation induced by Fc $\gamma$ RI cross-linking

Next, we characterized the effect of Fc $\gamma$ RI and CD13 co-cross-linking on Fc $\gamma$ RI-mediated signaling. A crucial step in Fc $\gamma$ R-mediated signal transduction is activation of tyrosine kinase Syk. Consequently, we examined the time-course of Syk phosphorylation induced by co-cross-linking of Fc $\gamma$ RI and CD13 in

U-937 cells and compared it with that induced by cross-linking Fc $\gamma$ RI alone.

As shown in Figure 5, A and B, the phosphorylation peak level of Syk was observed after 3 min of stimulation through Fc $\gamma$ RI alone. This level of phosphorylation started to decrease at 10 min. In contrast, co-cross-linking of Fc $\gamma$ RI and CD13 induced an increase in the maximum level of Syk phosphorylation after 10 min and its preservation for a longer period of time (up to 20 min). CD13 cross-linking alone was not able to induce Syk phosphorylation at any of the tested times (Fig. 5A), even using different concentrations of primary and secondary antibodies (not shown). Figure 5B shows the averages of densitometric quantification of the band corresponding to Syk in the antiphosphotyrosine immunoblots of five independent experiments similar to that shown in Figure 5A.

### CD13 partially colocalizes and coreistributes with Fc $\gamma$ RI

We used confocal microscopy to determine colocalization of the two molecules and coredistribution after aggregation of each of them. In resting, prefixed cells, using antibody incubation temperatures of 4°C, and in the presence of 0.1% sodium azide, there is colocalization of Fc $\gamma$ RI and CD13 only in cells in which both molecules are polarized (~40% of the cells; Fig. 6, A–D). These zones of polarization coincide with the zones of the membrane most prominently showing lamellipodia and filopodia as shown in Figure 6, E and F.

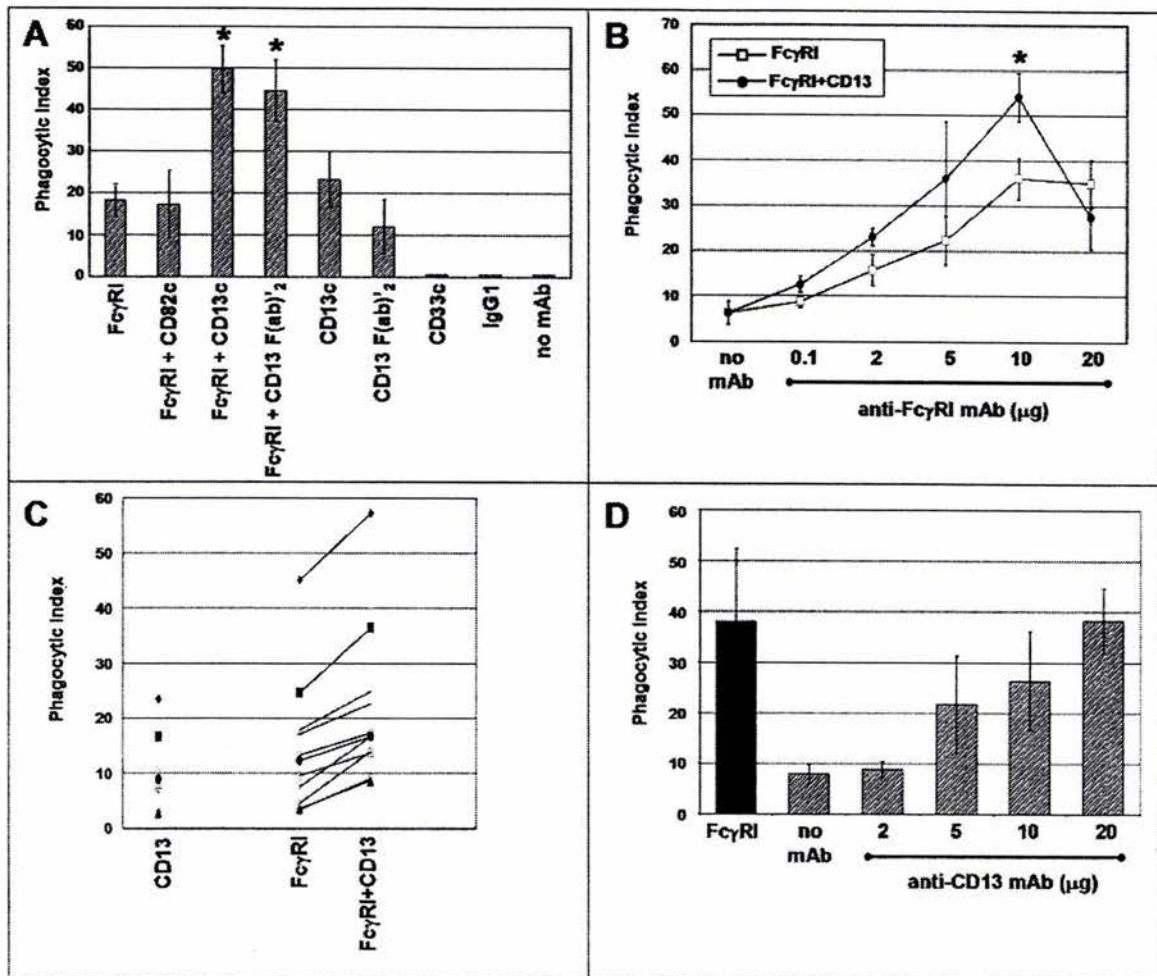
For coredistribution experiments, Fc $\gamma$ RI was aggregated at 37°C by anti-Fc $\gamma$ RI mAb followed by a secondary antibody. The cells were fixed, and staining of CD13 was conducted at 4°C. In these experiments, part of the population of CD13 redistributed to the zones of Fc $\gamma$ RI aggregation (Fig. 6, G–I). This redistribution was evident at 10 min of incubation at 37°C and reached its maximum at 20 min, after which it disappeared with both molecules located completely apart from one another (not shown).

When the opposite experiment was conducted, an almost complete redistribution of Fc $\gamma$ RI to the zones of secondary antibody-induced CD13 aggregation was seen (Fig. 6, J–L).

As a control, aggregation of Fc $\gamma$ RI did not induce redistribution of other molecules such as CD33 (Fig. 6, M–O).

## DISCUSSION

In the last few years, it has become increasingly evident that interactions between membrane molecules modulate cell signaling and thus, cell response. The possibility that Fc $\gamma$ R-mediated signaling is regulated by other membrane molecules has not been usually considered, and the generalized view is that Fc $\gamma$ R-mediated responses are mainly modulated by the balance between activatory and inhibitory isoforms of Fc $\gamma$ Rs involved in the interaction of the opsonized particle or antigen-antibody complex with the cell. However, a possible functional cooperation between Fc $\gamma$ Rs and CD13 had already been suggested [23, 24], and the results presented

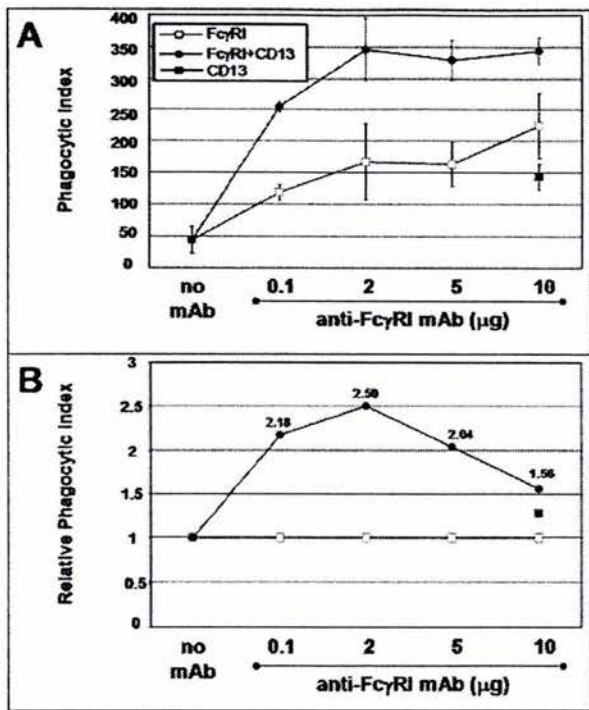


**Fig. 3.** Coaggregation of Fc $\gamma$ RI with CD13 increases the phagocytic capacity of U-937 cells and peripheral blood human monocytes. (A) U-937 cells were incubated with 10  $\mu$ g of the mAb specific for the indicated molecules for 30 min at 4°C. After washing, the cells were incubated for 90 min at 37°C with erythrocytes opsonized with F(ab) $_2$  fragments of biotin-labeled goat anti-mouse IgG (EBS-Ab). After lysis of noninternalized erythrocytes, phagocytosis was evaluated by light microscopy. Data are presented as the number of EBS-Ab internalized per 100 cells (Phagocytic Index). Mean  $\pm$  SD of six independent experiments; c = complete mAb. (B) Peripheral blood monocytes from human donors were incubated with the indicated concentrations of anti-Fc $\gamma$ RI mAb with (●) or without (□) F(ab) $_2$  fragments of anti-CD13 mAb (10  $\mu$ g) for 30 min. After washing, incubation with EBS-Ab was carried out at 37°C for 30 min. After lysis of noninternalized erythrocytes, the phagocytic index was determined by light microscopy. Data are the mean phagocytic index ( $\pm$ SE) of at least four different donors for each point. (\*) Statistically significant difference comparing Fc $\gamma$ RI + CD13 with Fc $\gamma$ RI alone;  $P < 0.05$ . (C) Peripheral blood monocytes from different human donors were incubated with 10  $\mu$ g anti-CD13 mAb, 10  $\mu$ g anti-Fc $\gamma$ RI, or the combination of the two antibodies and subsequently, with EBS-Ab, as indicated above. Each distinct symbol represents a different donor. (D) Peripheral blood monocytes from different human donors were incubated with different concentrations of anti-CD13 452 mAb and subsequently with EBS-Ab. Data represent mean and SD of at least four donors. Solid bar represents the phagocytic index obtained with 10  $\mu$ g anti-Fc $\gamma$ RI mAb.

in this paper further support a possible functional involvement of CD13 in Fc $\gamma$ R-mediated functions in monocytic cells.

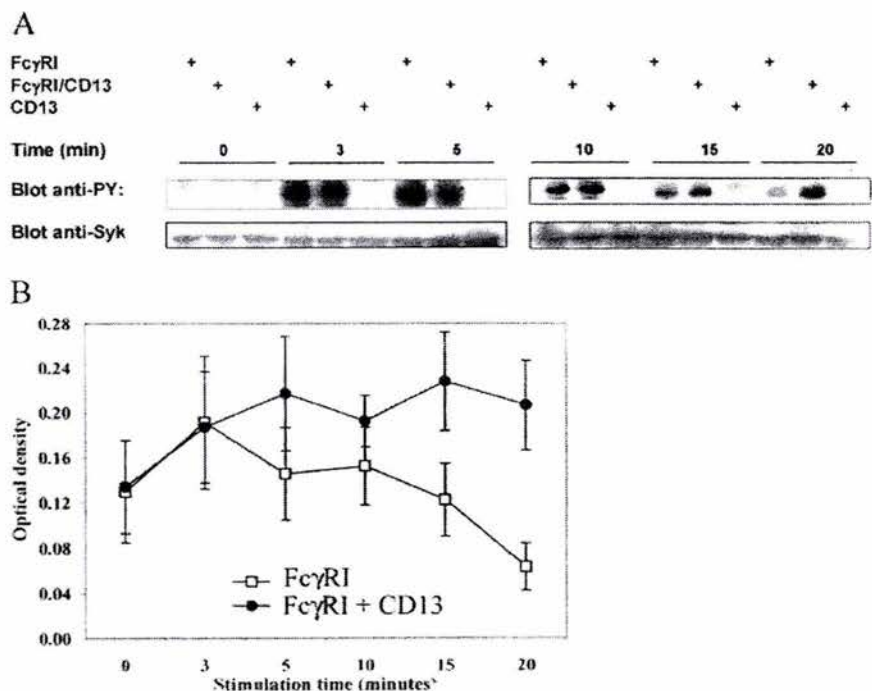
The first line of evidence suggesting a functional interaction between CD13 and Fc $\gamma$ R is the finding that CD13 redistributes to the zones of contact between IgG-opsonized erythrocytes and monocytic cells. Redistribution of CD13 to these zones is probably an active process, as incubation of monocytic cells with IgG-opsonized erythrocytes at 4°C does not induce redistribution of CD13. This also suggests that CD13 redistribution is related to the initiation of the internalization process and induced by signals generated by the Fc $\gamma$ RI aggregation rather than simply to the binding of IgG-opsonized erythrocytes. Moreover, a significant fraction

of CD13 molecules is internalized into the phagosomes with IgG-opsonized erythrocytes, suggesting a role for CD13 in phagocytosis. Additionally, some CD13-associated red fluorescence is also observed in the cytoplasm after phagocytosis. This may be attributable to endocytosis of CD13 occurring simultaneously to the phagocytic process. In this regard, Lohn et al. [33] reported endocytosis of CD13 at 37°C after occupation of the active center of CD13 with a mAb. Yet, another explanation for the presence of cytoplasmic CD13 can be the retrotranslocation of CD13 to the external phagosomal membrane (as suggested by CD13 distribution in Fig. 2A) and later, to the cytosol (Figs. 1M and 2C). Houde et al. [34] have shown retrotranslocation of phagosomal contents to the external phagosomal membrane



**Fig. 4.** Coaggregation of Fc $\gamma$ RI with CD13 increases the phagocytic capacity of monocyte-derived macrophages from human donors. Cells were incubated with the indicated concentrations of anti-Fc $\gamma$ RI mAb with or without F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb (10  $\mu$ g) or with anti-CD13 mAb alone (10  $\mu$ g) for 30 min. After washing, incubation with EBS-Ab was carried out at 37°C for 30 min. After lysis of noninternalized erythrocytes, the phagocytic index was determined by light microscopy. (A) Data represent the mean phagocytic index of cells from three different donors. (B) Data are presented as the relative phagocytic index, which corresponds to the ratio of the phagocytic index observed with the combination of the two mAb to the phagocytic index obtained with anti-Fc $\gamma$ RI mAb alone. The number close to each point corresponds to the fold increase attributable to CD13 co-cross-linking.

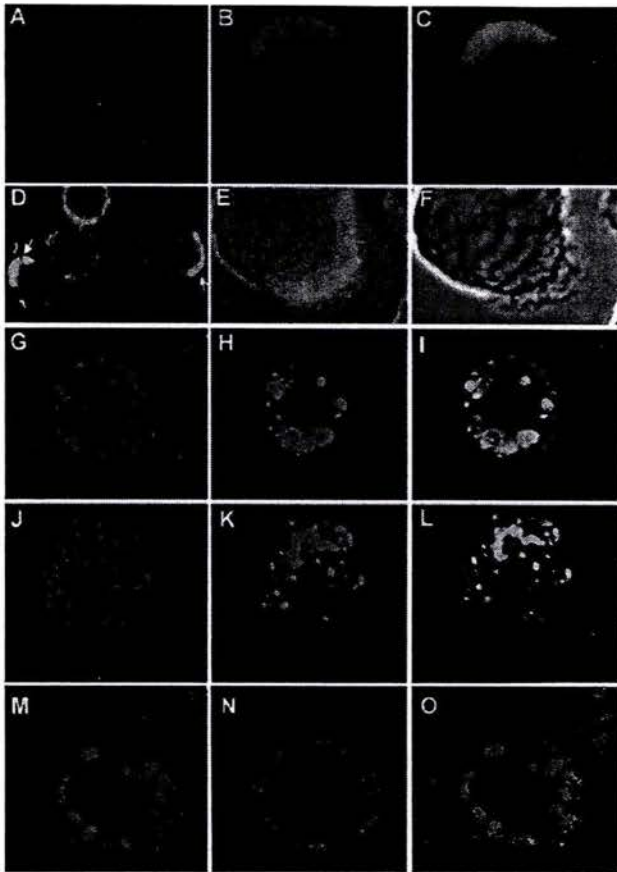
**Fig. 5.** Coaggregation of Fc $\gamma$ RI with CD13 induces a prolongation in the Syk phosphorylation level. (A) U-937 cells were incubated with 10  $\mu$ g each of anti-Fc $\gamma$ RI mAb, anti-CD13 mAb, or the combination of both antibodies. After cross-linking for 3, 5, 10, 15, or 20 min with F(ab) $'_2$  fragments of anti-mouse antibodies at 37°C, cells were lysed, and proteins were resolved on SDS-PAGE. Tyrosine-phosphorylated proteins were blotted with PY20-PY99 antiphosphotyrosine antibodies (Blot anti-PY). Bands in the upper panels show the phosphorylated protein in the molecular weight of Syk (72 kDa). To corroborate the identity of this band, the same membranes were stripped and reprobed with an anti-Syk polyclonal antibody (Blot anti-Syk). (B) Averaged data from five independent experiments as that shown in A. Each point represents the mean  $\pm$  SD of the optical density of the Syk band in the anti-PY blot.



and their subsequent presence in the cytoplasm 60 min after incubation of macrophages with latex-ovalbumin beads.

We have also shown that phagocytosable particles (EBS-Ab) bound through Fc $\gamma$ RI and CD13 are internalized more efficiently than similar particles bound to the monocyte through Fc $\gamma$ RI only, in peripheral blood monocytes, monocyte-derived macrophages, and U-937 cells.

An unexpected finding was that binding of EBS-Ab through CD13 alone was able to induce phagocytosis. Peripheral blood monocytes and U-937 cells preincubated with the anti-CD13 mAb or its F(ab) $'_2$  fragments were able to ingest EBS-Ab, but cells preincubated without anti-CD13 mAb or with other murine mAb of the same isotype specific for another highly expressed molecule of monocytes (CD33) or for a nonrelated antigen (DNP) do not ingest EBS-Ab. Furthermore, increasing doses of anti-CD13 mAb go along with a parallel increase in phagocytosis of EBS-Ab by monocytes. These findings show that phagocytosis of EBS-Ab is mediated specifically by CD13. Thus, CD13 is not only able to positively modulate Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, but under certain circumstances, it is able to mediate phagocytosis to an extent similar to that of Fc $\gamma$ RI (Fig. 3D), which might suggest that the increased phagocytic index observed when both molecules are engaged results from the sum of the individual phagocytosis. However, we cannot be certain of whether the effect of CD13 on Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis when both receptors are coaggregated is additive or synergistic. One point that might suggest that it is not an additive event is that the magnitude of the effect is not directly proportional to the phagocytic index observed with CD13 alone. Conversely, for a synergistic effect to be invoked, one would expect that at a given point, the phagocytosis obtained by engaging CD13 and Fc $\gamma$ RI should be significantly higher than the sum of the phagocy-



**Fig. 6.** Colocalization and core-distribution of CD13 with Fc $\gamma$ RI. (A–D) U-937 cells were prefixed with PFA. Fc $\gamma$ RI was stained first with anti-Fc $\gamma$ RI mAb and FITC-labeled F(ab) $'_2$  fragments of secondary antibody (B). CD13 was then stained by incubating cells with biotinylated F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb and streptavidin-TR at 4°C (A). (C) Colocalization of Fc $\gamma$ RI and CD13 (yellow) in a polarized cell. (D) A field showing CD13 and Fc $\gamma$ RI polarized in several cells (arrows). (E, F) Zones of Fc $\gamma$ RI and CD13 colocalization correspond to membrane zones showing lamellipodia and filopodia. (G–I) U-937 cells were incubated with anti-Fc $\gamma$ RI mAb followed by FITC-labeled secondary antibody for 20 min at 4°C. Cells were incubated at 37°C for 20 min to allow aggregation, and after fixation, CD13 staining was performed with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb at 4°C in the presence of sodium azide. (I) Zones of core-distribution of Fc $\gamma$ RI and CD13 as yellow aggregates. (J–L) U-937 cells were incubated with TR-labeled F(ab) $'_2$  fragments of anti-CD13 mAb, followed by incubation with a nonlabeled, secondary antibody for 20 min at 4°C and subsequently, at 37°C for 20 min to allow aggregation. After fixation, Fc $\gamma$ RI was detected with FITC-labeled anti-Fc $\gamma$ RI mAb at 4°C in the presence of sodium azide. (L) Core-distribution of Fc $\gamma$ RI and CD13. (M–O) U-937 cells were incubated with anti-Fc $\gamma$ RI mAb followed by phycoerythrin-labeled secondary antibody for 20 min at 4°C. Cells were incubated at 37°C for 20 min to allow aggregation, and after fixation, CD33 staining was performed with a FITC-labeled anti-CD33 mAb at 4°C under the same conditions of CD13 staining in G–I.

phagocytosis mediated by each receptor alone, and this was never observed. Nevertheless, the finding that CD13 is able to modulate Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis is noteworthy regardless of the synergistic or additive origin of the phenomenon.

The biological significance of CD13-mediated phagocytosis is difficult to establish at this point. From the dose-response curve (Fig. 3D), optimal CD13-mediated phagocytosis occurs

at concentrations of anti-CD13 mAb close to those required for saturation, indicating that an important fraction of CD13 should be engaged for phagocytosis to proceed. Whether these levels of CD13 engagement could be achieved *in vivo* is uncertain. Thus, CD13 participation in phagocytosis could be more relevant when CD13 is not the only receptor involved, especially when opsonization of the target is suboptimal.

Another important finding suggesting that CD13 regulates Fc $\gamma$ RI signaling is the observation that the level and duration of Syk phosphorylation are increased after Fc $\gamma$ RI and CD13 co-cross-linking as compared with the phosphorylation of Syk observed after Fc $\gamma$ RI cross-linking. This clearly shows that coaggregation of CD13 results in a modification of the biochemical signal elicited by Fc $\gamma$ RI cross-linking. The absolute requirement of Syk during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis is well established [35], and thus, it is tempting to propose that this effect could be related to the increased phagocytosis observed when the particle is able to cross-link Fc $\gamma$ RI and CD13. It is interesting that cross-linking of CD13 alone does not induce changes in the level of Syk phosphorylation, suggesting that CD13 cross-linking only affects the level of Syk phosphorylation when it is coaggregated with Fc $\gamma$ RI. As CD13 was able to mediate phagocytosis, the biochemical pathways involved in this phenomenon are apparently independent of Syk phosphorylation. These results are in line with those of Navarrete Santos et al. [23], who showed that inhibitors of tyrosine kinases were not able to block the initial Ca $^{++}$  peak induced by CD13 cross-linking in monocytes.

Finally, we have shown that although in a fraction of resting U-937 cells, Fc $\gamma$ RI and CD13 appear to distribute independently of each other, in those cells in which CD13 is polarized to a distinct zone of the membrane Fc $\gamma$ RI is found to colocalize with it. Moreover, when aggregation of Fc $\gamma$ RI is induced by an anti-Fc $\gamma$ RI mAb and a secondary antibody, part of the CD13 population redistributes to the zones of Fc $\gamma$ RI aggregation. Conversely, aggregation of CD13 by anti-CD13 and secondary antibody induces an almost complete redistribution of Fc $\gamma$ RI in peripheral blood monocytes and U-937 cells. As a control, Fc $\gamma$ RI aggregation does not induce redistribution of CD33.

Taken together, our results demonstrate that Fc $\gamma$ R aggregation (induced by IgG-opsonized erythrocytes or secondary antibodies) induces core-distribution of CD13, a phenomenon that could be of functional relevance, as under experimental conditions in which both molecules are coaggregated (i.e., phagocytosis of EBS-Ab and co-cross-linking for Syk phosphorylation determinations), a positive modulation of the Fc $\gamma$ R-induced signal is observed. The *in vivo* significance of the functional interaction between CD13 and Fc $\gamma$ RI remains to be established. An intriguing possibility is that CD13 establishes interactions with pathogen-derived molecules and that when CD13 and Fc $\gamma$ Rs bind to their ligands (i.e., an IgG-opsonized and CD13 ligand-containing pathogen), a positive modulation of the Fc $\gamma$ R-mediated signal occurs. Although a natural ligand for human CD13 on the surface of a phagocytosable pathogen has not been described, its role as a viral receptor is well known, and in the insect *Manduca sexta* and other insect species, CD13 binds the Cry1A(c) toxin of *Bacillus thuringiensis* [36]. Besides, Galectin-4 has been reported to act as a ligand for CD13 in the small intestinal brush border epithelia, and as a

result of the role of galectins as opsonins [37, 38], an enticing possibility is that these molecules function as ligands for CD13 in monocytes during phagocytosis. Finally, molecules known to be substrates or inhibitors of CD13 could be regarded as ligands in that they may trigger CD13-mediated signals, which given the extent of CD13 substrates described, would be of great relevance *in vivo*.

In addition, the participation of aminopeptidases in the processing of N-terminal-extended peptides is now well accepted [39], and a role for CD13 in the trimming of peptides in antigen-presenting cells, for major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-associated peptide generation, has been described [40–42]. Our results could point to a role of phagosome-internalized CD13 in processing peptides after phagocytosis.

It has been reported that part of the CD13 population is associated with lipid rafts [43]. FcγRs as well as other MRRs, such as BCR, TCR, and FcεRI, are mostly excluded from lipid rafts but translocate into them upon clustering [44–48]. Furthermore, there are indications that coreceptors influence the residency of MRRs in rafts [49]. Preliminary results in our laboratory show colocalization among FcγRI, CD13, and ganglioside M1 in the zones of polarization (unpublished results). Thus, it is tempting to suggest that CD13 could modify the affinity of FcγRs for rafts maintaining their residency there for longer periods of time. This could explain the prolongation in the peak level of Syk phosphorylation that we have observed, as Src family kinases responsible for the initial phosphorylation of tyrosines of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif reside predominantly in these membrane domains, and Syk itself has been shown to relocate into rafts after FcεRI aggregation [50]. Furthermore, the population of CD13 colocalizing with FcγRI during phagocytosis could correspond to that associated with rafts, taking into account that a role for lipid rafts has already been demonstrated in phagocytosis [51].

The results presented in this paper demonstrate that CD13 is able to modulate FcγR-mediated responses. Further studies are necessary to better characterize this phenomenon to establish its physiological importance.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from DGAPA, UNAM (Grant 213701), and CONACYT (Grant 45092). We thank Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute) for the kind donation of the hybridoma producing anti-CD13 mAb and Dr. Daniel Rodríguez-Pinto for carefully reading the manuscript. P. M-O. was supported by a fellowship from Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

## REFERENCES

1. Daéron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 203–234.
2. Ravetch, J. V., Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290.

3. Cox, D., Greenberg, S. (2001) Phagocytic signaling strategies: Fcγ receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin. Immunol.* **13**, 339–345.
4. Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Fernandez, G. C., Gomez, S., Alves-Rosa, M. F., Palermo, M. S., Isturiz, M. A. (2003) Immune complex-FcγR interaction modulates monocyte/macrophage molecules involved in inflammation and immune response. *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 200–207.
5. Clynes, R., Ravetch, J. V. (1995) Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* **3**, 21–26.
6. Takai, T. (2002) Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 580–592.
7. Ioan-Facsinay, A., de Kimpe, S. J., Hellwig, S. M., van Lent, P. L., Hofhuis, F. M., van Ojik, H. H., Sedlik, C., da Silveira, S. A., Gerber, J., de Jong, Y. F., Roozendaal, R., Aarden, L. A., van den Berg, W. B., Saito, T., Mosser, D., Amigorena, S., Izui, S., van Ommen, G. J., van Vugt, M., van de Winkel, J. G., Verbeek, J. S. (2002) FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* **16**, 391–402.
8. Lanier, L. (2001) Face off—the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 326–331.
9. Mina-Osorio, P., Ortega, E. (2004) Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes? *Trends Immunol.* **25**, 529–535.
10. Hooper, N. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1–6.
11. Olsen, J., Kokholm, K., Noren, O., Sjostrom, H. (1997) Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* **421**, 47–57.
12. Pierelli, L., Teofili, L., Menichella, G., Rumi, C., Paolini, A., Iovino, S., Puggione, P. L. (1993) Further investigations on the expression of HLA-DR, CD33 and CD13 surface antigens in purified bone marrow and peripheral blood CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* **84**, 24–30.
13. Bauvois, B. (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* **23**, 317–329.
14. Woodhead, V. E., Stonehouse, T. J., Binks, M. H., Speidel, K., Fox, D. A., Gaya, A., Hardie, D., Henniker, A. J., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Taskov, H., Todd III, R. F., van Agthoven, A., Katz, D. R., Chain, B. M. (2000) Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* **12**, 1051–1061.
15. Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Gaudelicko, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., Holmes, K. V. (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**, 420–422.
16. Sodeberg, C., Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson, S., Wahlberg, J. M., Moller, E. (1993) CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**, 6576–6585.
17. Larsson, S., Sodeberg-Naucler, C., Moller, E. (1998) Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13 positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation* **65**, 411–415.
18. Yu, X. J., Luo, C., Lin, J. C., Hao, P., He, Y. Y., Guo, Z. M., Qin, L., Su, J., Liu, B. S., Huang, Y., Nan, P., Li, C. S., Xiong, B., Luo, X. M., Zhao, G. P., Pei, G., Chen, K. X., Shen, X., Shen, J. H., Zou, J. P., He, W. Z., Shi, T. L., Zhong, Y., Jiang, H. L., Li, Y. X. (2003) Putative hAPN receptor binding sites in SARS-CoV spike protein. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 481–488.
19. Hoffmann, T., Faust, J., Neubert, K., Ansorge, S. (1993) Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett.* **336**, 61–64.
20. Ward, P. E., Benter, I. F., Dick, L., Wilk, S. (1990) Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase. *Biochim. Pharmacol.* **40**, 1725–1732.
21. Chomarat, P., Rissoan, M. C., Pin, J. J., Banchereau, J., Miossec, P. (1995) Contribution of IL-1, CD14 and CD13 in the increased IL-6 production induced by *in vitro* monocyte-synoviocyte interactions. *J. Immunol.* **155**, 3645–3652.
22. Kanayama, N., Kajiwara, Y., Goto, J., el Maraduy, E., Maehara, K., Andou, K., Terao, T. (1995) Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J. Leukoc. Biol.* **57**, 129–134.
23. Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell. Immunol.* **201**, 22–32.
24. MacIntyre, E. A., Roberts, P. J., Jones, M., van der Schoot, C. V. E., Favaloro, E. J., Tidman, N. (1989) Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. *J. Immunol.* **142**, 2377–2383.

25. Olsen, J., Cowell, G. M., Konigshofer, E. (1988) Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.* **238**, 307–314.
26. Löhn, M., Mueller, C., Thiele, T., Kähne, D., Riemann, D., Lagner, J. (1997) Aminopeptidase N-mediated signal transduction and inhibition of proliferation of human myeloid cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **421**, 85–91.
27. Navarrete Santos, A., Langner, J., Riemann, D. (2000) Enzymatic activity is not a precondition for the intracellular calcium increase mediated by mAbs specific for aminopeptidase N/CD13. *Adv. Exp. Med. Biol.* **477**, 43–47.
28. Tokuda, N., Levy, R. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 244–250.
29. Montaner, L., Collin, M., Herbein, G. (1996) Human monocytes: isolation, cultivation, and applications. In *Weir's Handbook of Experimental Immunology* (L. Herzenberg, D. M. Weir, L. Herzenberg, C. Blackwell, eds.), Cambridge, MA, Blackwell, 155.1–155.11.
30. Davies, J., Gordon, S. (2004) Isolation and culture of human macrophages. In *Basic Cell Culture Protocols* (C. Helgason, C. Miller, eds.), Totowa, NJ, Humana, 105–116.
31. Edberg, J., Kimberly, R. (1992) Receptor-specific probes for the study of Fcγ receptor-specific function. *J. Immunol. Methods* **148**, 179–187.
32. Lebel-Binay, S., Lagaudière, C., Fradelizi, D., Conjeaud, H. (1995) CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U-937 monocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 956–963.
33. Lohn, M., Mueller, C., Lagner, J. (2002) Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk. Lymphoma* **43**, 407–413.
34. Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Coyette, G., Laplante, A., Princiotta, M., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402–406.
35. Crowley, M., Costello, P. S., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tymbulewicz, V. L., de Franco, A. L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**, 1027–1039.
36. Knight, P. J., Carroll, J., Ellar, D. J. (2004) Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 101–112.
37. Danielsen, M. E., Deurs, B. (1997) Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2241–2251.
38. Mandrell, R. E., Apicella, M. A., Lindstedt, R., Leffler, H. (1994) Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol.* **236**, 231–254.
39. Rock, K., York, I., Goldberg, A. (2004) Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**, 670–677.
40. Amoscatto, A., Prenovitz, D., Lotze, M. (1998) Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. *J. Immunol.* **161**, 4023–4032.
41. Larsen, S. L., Pedersen, L. O., Buus, S., Stryhn, A. (1996) T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J. Exp. Med.* **184**, 183–189.
42. Dong, X., An, B., Salvucci, L., Storkus, W., Amoscatto, A., Salter, R. (2000) Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J. Immunol.* **164**, 129–135.
43. Navarrete Santos, A., Roentsch, J., Danielsen, M., Lagner, J., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 143–148.
44. Kono, H., Suzuki, T., Yamamoto, K., Okada, M., Yamamoto, T., Honda, Z. I. (2002) Spatial raft coalescence represents an initial step in FcγR signaling. *J. Immunol.* **169**, 193–203.
45. Kwiatkowska, K., Frey, J., Sobota, A. (2003) Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: role of membrane rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 537–550.
46. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., Pierce, S. K. (1999) A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* **190**, 1549–1560.
47. Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., He, H. T. (2000) Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 250–255.
48. Montixi C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimoniev, J. C., Dubois, M. A., Wurbel, J. P., Chauvin, M., Pierres, He, H. T. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* **17**, 5334–5348.
49. Cherukuri, A., Cheng, P., Sohn, H., Pierce, S. (2001) The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* **14**, 169–179.
50. Field, K. A. (1997) Compartmentalized activation of the high-affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 4276–4280.
51. Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J. (2001) Flotilin-1-enriched rafts domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18507–18512.