



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EL PAPEL DE CD13 (AMINOPEPTIDASA N) EN LA
FAGOCITOSIS EN MONOCITOS HUMANOS”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:
IRMA ILEANA LICONA LIMÓN**

**TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR:
DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO, FACULTAD DE MEDICINA
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D. F, JUNIO 2015



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.



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Fue financiado por los proyectos CONACYT (178803) y DGAPA-UNAM (IN210314). Durante el proyecto doctoral Ileana Licona recibió una beca del CONACYT (203753).

Indice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Fagocitosis.....	3
1.1.2 Receptores Fagocíticos	4
1.1.3 Receptores para cuerpos extraños	5
1.1.4 Receptores para cuerpos apoptóticos (Receptores <i>scavenger</i>).....	8
1.1.5 Otros receptores fagocíticos.....	9
1.1.6 Modulación de la ligación de la partícula.....	9
1.1.7 Transducción de señales durante la fagocitosis.....	10
1.1.8 Regulación de la fagocitosis por otras proteínas de membrana.....	14
1.2 CD13	15
1.2.1 Estructura.....	16
1.2.2 Funciones de CD13 dependientes de su actividad enzimática.....	18
1.2.3 Funciones de CD13 independientes de su actividad enzimática.....	18
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVO GENERAL.....	27
3.1 Objetivos particulares.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Construcción de las partículas fagocitables y ensayo de fagocitosis específica	28
4.2 CD13 media la internalización de EBS-Fabs en células THP-1.....	29
4.3 CD13 media fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDMs)	32
4.4 Fagocitosis en células deficientes de CD13	34
4.5 La fagocitosis mediada por CD13 depende del citoesqueleto de actina.....	37
4.6 La activación de Syk está involucrada en la fagocitosis mediada por CD13	38
4.7 PI3K es requerida durante la fagocitosis mediada por CD13	43
4.8 Diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD13 pueden mediar fagocitosis... 44	
4.9 La fagocitosis mediada por CD13 es independiente de su actividad enzimática	47
4.10 La expresión de CD13 en células epiteliales es suficiente para inducir fagocitosis mediada por CD13	48
4.11 La ligación de hCD13 expresado en macrófagos murinos induce la internalización de partículas y generación de ROS.....	51
4.12 Regulación mediada por CD13 de la actividad de otros receptores.....	53
4.12.1. La fagocitosis mediada por los FcγRs es regulada positivamente por el entrecruzamiento de CD13	53
4.12.2 El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3	55
5. DISCUSIÓN	58
6. MATERIALES Y MÉTODOS	66
6.1 MATERIALES.....	66
6.1.1 Anticuerpos	66
6.1.2 Reactivos.....	66
6.1.3 Plásmidos	67

6.2 MÉTODOS.....	68
6.2.1 Líneas celulares	68
6.2.2 Macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDMs).....	68
6.2.3 Fagocitosis a través de CD13 o FcγRI (Fagocitosis Selectiva).....	69
6.2.4 Determinación de actividad enzimática	70
6.2.5 Detección de la fosforilación de Syk inducida por entrecruzamiento de CD13 o FcγRI en hMDMs	71
6.2.6 Producción de las partículas lentivirales	72
6.2.7 Silenciamiento de la expresión de CD13 en células THP-1 mediante lentivirus shRNA.....	73
6.2.8 Generación de líneas celular con expresión estable de hCD13.....	74
6.2.9 Cuantificación de la producción de ROS	74
6.2.10 Ensayos de fagocitosis a través de FcγRs con entrecruzamiento simultaneo de CD13 por anticuerpos	75
6.2.11 Activación de CD11b inducida por el entrecruzamiento de CD13 por anticuerpos	75
6.2.12 Citometría de flujo	76
6.2.13 Análisis Estadístico	76
7. BIBLIOGRAFÍA	77

RESUMEN

CD13 es una ectopeptidasa de membrana altamente expresada en monocitos, macrófagos y células dendríticas. CD13 está involucrado en diversas funciones que incluyen la degradación de mediadores peptídicos, adhesión, migración, endocitosis de virus, señalización y modulación positiva de la fagocitosis mediada por Fc γ RI y por otros receptores fagocíticos. En este trabajo, exploramos si además de actuar como un receptor accesorio, CD13 humano (hCD13) es un receptor fagocítico primario. Encontramos que CD13 media la fagocitosis eficiente de partículas grandes, modificadas para interactuar con la célula solamente a través de CD13, en la línea celular monocítica THP-1 y en macrófagos humanos. La magnitud de la fagocitosis mediada por CD13 es comparable a la fagocitosis mediada por el receptor fagocítico canónico Fc γ RI. Además, demostramos que la expresión de hCD13 en la línea celular no fagocítica HEK293 es suficiente para capacitar a estas células para internalizar partículas grandes a través de CD13. La fagocitosis mediada por CD13 es independiente de otros receptores fagocíticos, ya que ocurre en ausencia de Fc γ Rs, CR3 y otros receptores fagocíticos. La fagocitosis a través de CD13 es independiente de su actividad enzimática, pero es dependiente del re-arreglo del citoesqueleto de actina y de la activación de PI3K, y es parcialmente dependiente de la activación de Syk. Encontramos también que el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos induce una fosforilación rápida de Syk en macrófagos humanos. Finalmente, el entrecruzamiento por anticuerpos de hCD13 expresado en la membrana de la línea celular macrofágica murina, induce la producción de especies reactivas de oxígeno. Nuestros resultados demuestran que CD13 es un receptor fagocítico competente, capaz de mediar la internalización de partículas grandes.

ABSTRACT

CD13 is a membrane-bound ectopeptidase highly expressed on monocytes, macrophages and dendritic cells. CD13 is involved in diverse functions, including degradation of peptide mediators, cellular adhesion, migration, viral endocytosis, signaling, and positive modulation of phagocytosis mediated by Fc γ Rs and other phagocytic receptors. In this work, we explored whether besides acting as an accessory receptor, CD13 by itself is a primary phagocytic receptor. We found that human CD13 (hCD13) mediates efficient phagocytosis of large particles (erythrocytes) modified so as to interact with the cell only through CD13 in both human macrophages and THP-1 monocytic cells. The extent of this phagocytosis is comparable to the phagocytosis mediated through the canonical phagocytic receptor Fc γ RI. Furthermore, we demonstrated that hCD13 expression in the non-phagocytic cell line HEK-293 is sufficient to enable these cells to internalize particles bound through hCD13. CD13 mediated phagocytosis is independent of other phagocytic receptors since it occurs in the absence of Fc γ Rs, CR3, and most phagocytic receptors. Phagocytosis through CD13 is independent of its enzymatic activity, but is dependent on actin rearrangement and activation of PI3K, and is partially dependent on Syk activation. Moreover, crosslinking CD13 with antibodies rapidly induced Syk phosphorylation in human macrophages. Finally, we observed that antibody-mediated crosslinking of hCD13 expressed in the murine macrophage-like J774 cell line induces production of reactive oxygen species. These results demonstrate that CD13 is a fully competent phagocytic receptor capable of mediating internalization of large particles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso por el cual las células internalizan distintos tipos de blancos particulados, dentro de los que se encuentran microorganismos y células apoptóticas. Para distinguirla de otros procesos endocíticos, la fagocitosis se define como la internalización de partículas mayores a $0.5 \mu\text{m}$, es un evento mediado por receptor, depende del rearrreglo del citoesqueleto de actina y es independiente de clatrina. Así la pinocitosis se define como la internalización de fluidos y solutos, en un proceso que no es mediado por receptor y que puede ser dependiente (macropinocitosis) o independiente de actina; y la endocitosis mediada por receptor es un evento de internalización de partículas menores a $0.5 \mu\text{m}$, como virus y macromoléculas, que es independiente de actina pero dependiente de clatrina [1,2].

La fagocitosis es un mecanismo que apareció temprano en la evolución. En organismos unicelulares la fagocitosis está relacionada con internalización de nutrientes, mientras en los animales multicelulares, participa en la homeostasis, remodelación de tejido y en los mecanismos de defensa mediante la internalización y destrucción de patógenos [3,4].

La fagocitosis se inicia por la interacción de la partícula con receptores específicos en la membrana celular. La activación de estos receptores inicia una cascada de señalización intracelular local que induce polimerización de actina y remodelación de la membrana plasmática, que resulta en la formación de extensiones de la membrana enriquecidas en actina en la zona de interacción de la partícula con los receptores, llamada copa fagocítica. La activación de los receptores es un proceso iterativo alrededor de la partícula que culmina en el encerramiento de la partícula en estructuras especializadas llamadas fagosomas. Los fagosomas maduran por fusión progresiva con endosomas y lisosomas, turnándose así en organelos microbicidas [4]. Durante la fagocitosis, una gran parte de la membrana es internalizada, lo que alteraría la composición de las membranas si no existiera un mecanismo eficiente de selección de las moléculas que serán internalizadas. Algunas moléculas de superficie son específicamente excluidas de la copa fagocítica como las moléculas del MHC [5-8], mientras que otras

proteínas como las integrinas $\beta 1$ son movilizadas hacia la copa [8,9], por lo que se acepta que la presencia de una proteína en la copa fagocítica sugiere su participación en la fagocitosis.

El sistema inmune posee un grupo de células especializadas en la internalización de microorganismos de manera rápida y eficiente en sitios de inflamación denominados fagocitos profesionales. A este grupo pertenecen los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas. Existen otros tipos celulares que poseen cierta capacidad fagocítica denominados fagocitos no profesionales, dentro de los que se encuentran células endoteliales, epiteliales y fibroblastos, que normalmente no son fagocíticos pero que son capaces de internalizar cuerpos apoptóticos en condiciones excepcionales, como durante la involución de un tejido o en condiciones de daño tisular excesivo [10,11]. A diferencia de los fagocitos profesionales, que participan en la respuesta inmune y en la remodelación/reparación de tejido, los fagocitos no profesionales están involucrados únicamente en remodelación/reparación de tejido. Los fagocitos profesionales son un componente esencial tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa, ya que al internalizar y destruir microorganismos patogénicos por fagocitosis (innata), inician la respuesta inmune adaptativa mediante la presentación del material internalizado a las células linfoides y contribuyen a la inflamación mediante la producción de citocinas. La diferencia fundamental entre los fagocitos profesionales y los fagocitos no profesionales radica en la presencia de un conjunto de receptores específicos presente solamente en los fagocitos profesionales, claramente demostrado por la capacidad de transferir alto potencial fagocítico a células epiteliales o fibroblastos tras la transfección de receptores fagocíticos normalmente expresados en fagocitos profesionales [12,13].

Las partículas que pueden ser internalizadas por fagocitosis presentan una gran variedad estructural, por lo que los fagocitos profesionales a su vez, expresan un gran número de receptores con distinta especificidad.

1.1.2 Receptores Fagocíticos

Los receptores fagocíticos son estructuralmente diversos e incluyen a una variedad de familias de receptores [1,14], como la superfamilia de las inmunoglobulinas

(como los receptores $Fc\gamma$: $Fc\gamma RI$, IIa, IIc y IIIa), integrinas (como CR3, CR4, $\alpha_5\beta_1$ y LFA-1) [15-18], receptores *scavenger* (como SR-I, CD36 y MARCO) [19-21], lectinas tipo C (como Dectina-1, DC-SIGN y el receptor de manosa), glicoproteínas (como CD44) [22], y moléculas de adhesión (como CEACAM-3) [23]. Estos receptores son co-expresados en los fagocitos y colaboran en la detección e internalización de las partículas, que generalmente poseen diversos patrones moleculares y opsoninas. Sin embargo, no todos los receptores activados en el curso de la fagocitosis son receptores fagocíticos, algunos funcionan modulando la respuesta, pero son incapaces de iniciar la internalización de la partícula, como los TLRs (Toll-like receptors), por lo que ha sido difícil definir y categorizar a los receptores fagocíticos *bona fide*. La definición operacional más confiable consiste en la expresión ectópica: un receptor puede ser considerado fagocítico si es capaz de inducir internalización de partículas tras su expresión heteróloga en un tipo celular no fagocítico [4].

El repertorio de receptores fagocíticos expresado por los fagocitos profesionales es grande y complejo y solo algunos de los receptores han sido estudiados en detalle. En la Tabla 1 se muestra una selección de receptores que incluye miembros de distintas familias con sus ligandos.

Los receptores fagocíticos se pueden clasificar en dos grandes grupos, aquellos que reconocen e internalizan cuerpos extraños, como microorganismos patogénicos, y aquellos que reconocen e internalizan cuerpos apoptóticos. Cuando los fagocitos internalizan cuerpos extraños inducen una respuesta inflamatoria, mientras que cuando fagocitan a través de receptores de cuerpos apoptóticos liberan mediadores anti-inflamatorios, previniendo así un mayor daño tisular [1].

1.1.3 Receptores para cuerpos extraños

La detección y eliminación de cuerpos extraños fue una de las primeras funciones reconocidas de la fagocitosis. Los receptores interactúan con su presa fagocítica ya sea directamente (receptores de reconocimiento directo) o a través de opsoninas (proteínas endógenas que cubren a la partícula que será fagocitada).

Receptores opsónicos

<i>Receptores Fc</i>	
FcγRI (CD64)	Alta afinidad IgG1 = IgG3 > IgG4
FcγRIIa (CD32a)	Baja a media afinidad IgG1 > IgG2, IgG3, IgG4
FcγRIIc (CD32c)	Baja afinidad IgG1, IgG3, IgG4
FcγRIIIa (CD16a)	Alta afinidad IgG3, baja a media afinidad IgG1 > IgG4
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2
FcεRI	IgE
<i>Integrinas</i>	
CR3 (αMb2, CD11b/CD18, Mac-1)	iC3b, Factor X, factor H, t-PA, fibrinógeno, kininógeno, fibronectina, collagena, elastasa, plasminógeno, ICAM, GPIb, proteínas desnaturalizadas
CR4 (αXβ2, CD11c/CD18, gp150/95)	iC3b, fibrinógeno, ICAM, proteínas desnaturalizadas
CR1 (CD35)	C1q, C4b, C3b, lectina de unión a manosa (MBL)
α5β1	Fibronectina, osteopontina
PRRs	
Dectin-1 (CLEC7A)	β1,3-glucanos
CD14	Proteína de unión a lipopolisacárido (LBP)
Receptor de manosa (CD206)	Mannano
BaII	Lipopolisacárido
<i>Receptores Scavenger</i>	
CD36	Eritrocitos infectados con <i>plasmodium falciparum</i>
MARCO	Bacterias gram positivas y gram negativas
Receptor Scavenger 4 (CD204)	Lipopolisacárido, Ácido lipoteicoico
Receptores de cuerpos apoptóticos	
<i>Receptores para fosfatidilserina (PS)</i>	
TIM-4	Fosfatidilserina
BaII	Fosfatidilserina
Stabilin-2	Fosfatidilserina
CD300f	Fosfatidilserina
Receptores TAM	Gas6, proteína S
LRP1 (CD91)	C1q, calreticulina
<i>Integrinas</i>	
αVβ3	MFG-E8, Del-1, vitronectina, vWF, PECAM-1, tenascina, BSP, osteopontina, trombospondina, LAP-TGFβ, fibrinógeno
αVβ5	MFG-E8, Del-1, vitronectina, osteopontina, BSP
<i>Receptores scavenger</i>	
CD36	Lípidos oxidados como fosfatidilserina y fosfatidilcolina
SCARF-1	Fosfatidilserina opsonizada con C1q

Tabla 1. Receptores fagocíticos humanos y sus ligandos (Freeman, S. A. and Grinstein, S. (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunological reviews 262, 193-215)

1.1.3a Receptores de reconocimiento directo

Las partículas extrañas, como bacterias, hongos y parásitos, expresan moléculas

que no se encuentran en organismos superiores, a las que se ha nombrado Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*).

Los PAMPs son detectados por un grupo de receptores codificados en la línea germinal, denominados Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés *Pathogen Recognition Receptors*). Los PAMPs son esenciales para la supervivencia del patógeno, por lo que presumiblemente no pueden ser alterados sustancialmente por la presión de selección de la inmunidad innata. Algunos PRRs están involucrados solamente en la detección de patógenos pero no son capaces de inducir fagocitosis, como es el caso de los TLRs [24] que inducen un programa genético que promueve la fagocitosis pero son incapaces de mediar fagocitosis tras su expresión heteróloga; mientras que otros receptores están involucrados tanto en la detección como en la inducción de fagocitosis de microorganismos. La pared celular de los hongos está compuesta de glucanos, mananos, glicoproteínas y quitina, por lo que los fagocitos expresan un grupo de receptores de lectina tipo C (CLRs) que se unen a carbohidratos, como Dectina-1, Dectina-2, Mincle, CLECSF8 y CLEC5A [25,26]. Los polisacáridos presentes en la superficie de algunas levaduras se unen al receptor de manosa [27] o a Dectina-1 [28], y el lipopolisacárido presente en las bacterias gram-negativas es detectado por el receptor *scavenger* A [29]. La evidencia en la literatura concuerda con que Dectina-1 es un receptor fagocítico, como se mostró con su expresión heteróloga [13,28]. En cambio en otros casos, como en el del receptor de manosa [27,30], la contribución del PRR en la fagocitosis es controversial y podría ocurrir indirectamente, ya sea por la inmovilización del blanco fagocítico a la célula o mediante la activación de la respuesta fagocítica que será finalmente mediada por otros receptores.

Actualmente, el repertorio de receptores fagocíticos de PAMPs es limitado, y no cubre el espectro completo de agentes infecciosos a los que los fagocitos profesionales enfrentan. Por lo que se espera que la lista de PRRs se expanda en el futuro.

1.1.3b Receptores de reconocimiento indirecto: Receptores de Oponinas

Los cuerpos extraños también pueden ser reconocidos por moléculas solubles que circulan en la sangre y en los fluidos intersticiales, funcionando como PRRs solubles, llamadas opsoninas. Las inmunoglobulinas que reconocen antígenos extraños, y las

proteínas de la cascada del complemento que se depositan en la superficie de los microorganismos, son las opsoninas más representativas.

Después de su deposición en la superficie de las partículas, las opsoninas interactúan con sus receptores en la membrana de los fagocitos, que de manera indirecta se aseguran a la superficie de su presa. Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRs) y el receptor de complemento 3 (CR3) que une al componente del complemento iC3b, son particularmente efectivos en la inducción de la fagocitosis por lo que son los receptores fagocíticos más estudiados [15,31]. El reconocimiento de la porción constante de las inmunoglobulinas G por los FcγRs, les otorga una gran flexibilidad en el tipo de partículas que pueden internalizar, determinada por la porción Fab de los anticuerpos.

El receptor de complemento 3 (CR3), también ha mostrado ser extraordinariamente promiscuo, capaz de unir 30 ligandos diferentes; como resultado de esto, a pesar de ser un representante clásico de los receptores de opsoninas, el CR3 puede mediar fagocitosis de partículas opsonizadas y sin opsonizar.

1.1.4 Receptores para cuerpos apoptóticos (Receptores *scavenger*)

La apoptosis es un mecanismo fisiológico. En individuos sanos, millones de células mueren cada día, y la remoción de los cuerpos apoptóticos es crucial para el mantenimiento de la homeostasis. A pesar de su importancia, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos no había sido estudiada a fondo sino hasta recientemente. De manera análoga al reconocimiento de cuerpos extraños, el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por los fagocitos involucra tanto receptores de reconocimiento directo como receptores de opsoninas. Los cuerpos apoptóticos exponen en la superficie varias moléculas que las distinguen de células sanas. El marcador más característico de células apoptóticas es la fosfatidil serina (PS). Este lípido está confinado a la parte interna de la membrana plasmática en células sanas, pero en células apoptóticas se encuentra en la parte externa. Receptores de la familia TIM (*T cell immunoglobulin mucin*) [32], BAI1 [33] y Stabilin-2 [34], median la unión directa a PS, mientras que otros receptores como las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ interactúan con células apoptóticas a través de opsoninas que reconocen a la PS como MFG-E8. De la misma forma, moléculas como Gas6 y la proteína S pueden

unir PS a los receptores de la familia TMA (Tyro3, Axl y Mer). Productos derivados del metabolismo de PS también pueden contribuir al reconocimiento de cuerpos apoptóticos; algunos receptores fagocíticos como CD36 y CD68 unen lípidos modificados y PS oxidado.

Los receptores scavenger se identificaron originalmente por su capacidad de reconocer lipoproteínas modificadas, sin embargo en los últimos años se ha mostrado que también participan en la fagocitosis de patógenos. Además de reconocer estructuras en los cuerpos apoptóticos, algunos receptores como SR-A1, MARCO, CD36, LOX1, SCARF1 y Stabilin-2, pueden unir ligandos exógenos como bacterias Gram (+) y Gram (-) [35].

1.1.5 Otros receptores fagocíticos

La lista de receptores fagocíticos se ha expandido en los últimos años con la adición de otras integrinas capaces de mediar fagocitosis como $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ y LFA-1 [16-18,36], y de moléculas de adhesión de la familia de CEACAM [23,37], ICAM-3 [18], y la glicoproteína CD44 [22,38]. Y se supone que lejos de ser una propiedad particular de ciertas integrinas o de moléculas de adhesión, su capacidad de mediar fagocitosis está asociada con la capacidad de estas proteínas de señalizar al citoesqueleto de actina [39].

1.1.6 Modulación de la ligación de la partícula

Para que exista una activación efectiva de los receptores fagocíticos por la partícula se deben considerar tanto las variables espaciales como las temporales, y tanto el fagocito como la partícula determinan el resultado. Así, el tamaño, la forma y la dureza de la partícula, son variables que influyen la velocidad y la magnitud de la internalización [40-42]. Esto es importante porque los fagocitos internalizan partículas rígidas y pequeñas, como bacterias, y partículas grandes, como cuerpos apoptóticos. A este respecto, es cada vez más evidente que la maquinaria molecular difiere cuando los macrófagos internalizan partículas pequeñas ($\approx 1 \mu\text{m}$) de cuando internalizan partículas grandes (más de $5 \mu\text{m}$), incluso cuando receptores y ligandos idénticos están involucrados [43,44]. Además, los fagocitos generalmente enfrentan partículas de formas elaboradas, como las hifas fungales o bacterias espirales. No sólo la geometría de estos

blancos es un reto, sino que también la distribución de los ligandos en su superficie que puede no ser homogénea, llevando a una activación asincrónica de diferentes receptores durante el proceso de internalización.

A pesar de estas grandes diferencias, todos los blancos fagocíticos comparten una propiedad común: presentan al fagocito un arreglo de ligandos multivalentes. Esta característica es crítica para la activación de los receptores fagocíticos, los cuales son activados invariablemente por su agregación lateral en el plano de la membrana. A diferencia de otros receptores, como los receptores de factores de crecimiento y los GPCRs (*G-protein coupled receptors*) que sufren un cambio conformacional transmembranal como consecuencia de la unión de sus ligandos, los receptores fagocíticos se activan cuando su densidad local es elevada como consecuencia de la inmovilización de los receptores por sus ligandos yuxtapuestos cercanamente en la superficie de la partícula fagocitable [4].

1.1.7 Transducción de señales durante la fagocitosis

Las fagocitosis de partículas a través de los receptores de opsoninas Fc γ Rs y CR3, son las mejor caracterizadas bioquímicamente, y sirven como un modelo general de la fagocitosis que se puede ajustar a otros receptores, como se ha mostrado en los últimos años con la caracterización parcial de las vías de varios receptores como Dectina-1 [28], CD44 [22], CEACAM3 [23] y receptores *scavenger* [45]. Aunque existen algunas características bioquímicas únicas para cada receptor, como la sensibilidad a inhibidores de microtúbulos de CR3 [46], las vías de señalización de los receptores fagocíticos caracterizados comparten un gran número de propiedades, como la dependencia en citoesqueleto de actina y en la activación de cinasas como PI3K, PKC y MAPKs.

El proceso de la fagocitosis puede separarse conceptualmente en tres etapas: 1) Unión de la partícula fagocítica al receptor, 2) Agregación del receptor, lo que resulta en una cascada de señalización y 3) Internalización de la partícula en un proceso dependiente de actina. En la siguiente sección se discutirá la señalización a través de los Fc γ Rs como un modelo de señalización y se añadirá la información disponible acerca de otros receptores.

1.1.7a Agregación y eventos tempranos de señalización

Los Fc γ Rs, como otros receptores fagocíticos, no se activan por ligandos monovalentes [47], se requieren de ligandos multivalentes para inducir señalización [48]. La agregación lateral de los receptores mediada por la interacción con la partícula, acerca entre sí a los dominios citosólicos de varios receptores Fc. Estos dominios citosólicos contienen una región única de los inmunorreceptores esencial para la señalización, los denominados motivos de activación basados en tirosina de los inmunorreceptores (ITAMs, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Los ITAMs se caracterizan por un motivo en tándem YxxI/L, el cual es sustrato de fosforilación por las cinasas de tirosina de la familia Src [49-51]. El ITAM en los receptores puede ser parte de la misma cadena polipeptídica que une al ligando, como en el caso de los Fc γ RIIa y IIc, o puede ser una subunidad γ separada que se asocia en forma no covalente con la subunidad del receptor que une al ligando, como en el caso de los Fc γ RI y IIIa.

Luego de la fosforilación de los ITAMs por las cinasas Src, la cinasa Syk (*Spleen tyrosine kinase*) es reclutada al complejo y activada. Syk posee dos dominios SH2 (*Src Homology 2*) que se unen a los ITAMs fosforilados [52]. Syk es esencial para la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, puesto que los macrófagos deficientes de Syk no pueden completar la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs [53,54]. De manera interesante, la polimerización de actina no se elimina totalmente en los macrófagos deficientes de Syk, ya que se observa la formación de la copa fagocítica alrededor de la partícula aunque la fagocitosis se arresta en un estadio temprano [53], lo que sugiere que aunque Syk es esencial para la fagocitosis, existen otras señales tempranas inducidas independientemente de esta cinasa.

La participación de Syk en la fagocitosis de otros receptores que contienen motivos tipo ITAM, como Dectin-1 y CEACAM3 no es tan clara. Se ha mostrado que Syk es fosforilado durante la fagocitosis a través de Dectina-1 en macrófagos [55], sin embargo la fagocitosis a través de Dectina-1 no es dependiente de la activación de Syk en macrófagos [28,55] pero sí es dependiente de la activación de Syk en otros tipos celulares [28], lo que sugiere que la fagocitosis mediada por Dectina-1 podría involucrar a otras cinasas tempranas además de Syk. Por otro lado, se ha mostrado que los motivos tipo

ITAM de CEACAM3 pueden ser fosforilados por las cinasas Src *in vitro*, y que la fagocitosis a través de CEACAM3 se abate con el uso de mutantes inactivas de Src, lo que sugiere la participación de Syk en esta fagocitosis [23].

El papel de Syk en la fagocitosis mediada por CR3 también es controversial. Por mucho tiempo se asumió que la fagocitosis mediada por CR3 era independiente de Syk, ya que el CR3 no posee motivos ITAMs; además se mostró en trabajos anteriores que la fagocitosis a través de CR3 es normal en macrófagos de ratones deficientes de Syk [54]. Sin embargo, recientemente se mostró que Syk es fosforilado durante las fagocitosis a través de CR3, y que la fagocitosis es severamente disminuida como resultado de la transferencia de siRNA anti-Syk o por una forma dominante negativa de Syk en las células diferenciadas tipo macrófago HL-60 [56]. Se ha sugerido que la diferencia en los resultados entre estos trabajos se debe a que los macrófagos de los ratones deficientes de Syk podrían sobre-exresar otras cinasas como ZAP-70, como un mecanismo compensatorio a la ausencia de Syk. Existen otros ejemplos de receptores fagocíticos carentes de motivos ITAMs que dependen de Syk para inducir fagocitosis, como es el caso de CD44 [22]. El mecanismo de reclutamiento de Syk a los receptores carentes de ITAMs es incierto, pero se sugiere que proteínas adaptadoras como DAP-12 o la cadena γ de los FcRs podrían ser las responsables [57,58].

1.1.7b Eventos intermedios de señalización

Durante la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, la fosforilación de Syk resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se unen a las cinasas de tirosina y actúan como plataformas para el reclutamiento de otros componentes de la vía de señalización. LAT se une a Syk y es fosforilada por ésta [59,60]. La fosforilación de LAT genera sitios de anclaje para proteínas adaptadoras adicionales como Grb2, GabII y CrKII. Las proteínas adaptadoras parecen ser críticas para la señalización, ya que la fagocitosis se inhibe en macrófagos deficientes de Gab2 o por el silenciamiento con RNAi de CrkII [61]. Grb2 se une a LAT a través de su dominio SH2, quien a su vez recluta a Gab2. La unión de Gab2 al complejo de señalización es estabilizada aún más por su interacción, a través de su dominio PH (*pleckstrin homology*), con el fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃) generado en la vecindad de los receptores activados.

Los lípidos juegan un papel esencial coordinando los eventos de señalización que llevan a la fagocitosis. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂) está presente en cantidades sustanciales en la membrana de los fagocitos. Durante la fagocitosis, la concentración de PI(4,5)P₂ aumenta temporalmente en los pseudópodos que forman la copa fagocítica, pero decae rápidamente conforme el fagosoma se cierra [62]. La desaparición drástica de PI(4,5)P₂ correlaciona con la movilización de PLC γ y PI3K a la misma zona de la membrana. PLC γ y PI3K al modificar al PI(4,5)P₂ generan mensajeros como DAG, IP₃ y PI(4,5)P₃ involucrados en el cierre del fagosoma [63-65]. El reclutamiento de PI3K es un evento crucial en la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, ya que la inhibición de PI3K inhibe completamente la fagocitosis de partículas grandes ($\approx 3 \mu\text{m}$) pero tiene un efecto modesto en la internalización de partículas más pequeñas [44,66]. Algunos de los productos lipídicos de la activación de PI3K reclutan GEFs, que a su vez activan a GTPasas como Rac 1 y 2 [67] y Cdc42, eventos necesarios para que se inicie el rearrreglo del citoesqueleto de actina. La inactivación de Cdc42, resulta en una inhibición completa de la polimerización de actina y por consiguiente, en la inhibición de la fagocitosis [67,68].

Las fagocitosis a través de Dectina-1, CD44, CR3 y algunos receptores *scavenger*, al igual que la fagocitosis a través de los Fc γ Rs, depende de PI3K, PKC y GTPasas [22,28,45,69]. Aunque el tipo de GTPasa activada difiere entre los receptores: la fagocitosis a través de CD44 depende de Rac1 y Rac2 [22], la fagocitosis a través de Dectina-1 depende de Rac1 y Cdc42 [28], mientras que la fagocitosis a través de CR3 activa a RhoA y es independiente de Cdc42 y Rac1 [67,70].

1.1.7c Polimerización de actina

El hecho de que la polimerización de actina es un evento necesario en la fagocitosis está fuera de discusión; todos los receptores fagocíticos dependen del citoesqueleto de actina para inducir internalización de partículas como lo ha mostrado el empleo de citocalasinas [1,2,4,22,28,39,45,69,71,72]. De tal manera que una de las características definitorias de la fagocitosis es su dependencia en el rearrreglo del citoesqueleto de actina [1,2,4,39,71]. La fagocitosis requiere de la remodelación controlada del citoesqueleto para sostener la deformación extensiva que sufre la

membrana. Este proceso es muy complejo, pero se puede dividir en cuatro etapas. Debido a que la forma y tensión de los fagocitos en reposo es estabilizada por la asociación del citoesqueleto a la membrana cortical, el primer paso de la fagocitosis involucra el rompimiento de esta asociación. Este rompimiento libera monómeros de G-actina para la incorporación en nuevos filamentos e incrementa la movilización de los receptores no ligados y de fosfatasa. El segundo paso, consiste en la nucleación de los filamentos de actina para iniciar la polimerización de F-actina y la extensión de pseudópodos. La tercer etapa consiste en el cierre del fagosoma, que involucra despolimerización de actina de la base de la copa fagocítica. Y la etapa final involucra el transporte del fagosoma hacia el interior de la célula para su maduración. Cada una de estas etapas requiere la activación/inactivación espacial y temporal precisa de las proteínas que regulan las dinámicas del citoesqueleto, como las GTPasas y los GEFs mencionados.

Los datos disponibles actualmente de las vías de señalización durante la fagocitosis indican que hay un alto grado de conservación en rutas bioquímicas requeridas durante la fagocitosis. Todos los receptores fagocíticos usan las mismas vías de señalización que llevan a la polimerización de actina y a la internalización de la partícula, por lo que se sugiere que *in vivo*, en donde múltiples receptores están presentes en la superficie de la célula y son activados simultáneamente, la fagocitosis de un receptor fagocítico sea susceptible de ser regulada por el otro receptor fagocítico, o por otros receptores que puedan sostener o regular la activación de eventos moleculares comunes.

1.1.8 Regulación de la fagocitosis por otras proteínas de membrana

Se ha descrito a un conjunto de proteínas de membrana que no son receptores fagocíticos, pero que pueden regular la fagocitosis mediada por los receptores fagocíticos. El ejemplo clásico de un receptor que regula la fagocitosis sin mediar la internalización de partícula son los TLRs, que al ser ligados por los PAMPs en la superficie de los patógenos inducen la expresión de genes relacionados con la fagocitosis que finalmente llevan a una regulación positiva de la fagocitosis [24]. En cuanto a la modulación entre receptores fagocíticos, un grupo importante de evidencia muestra que la fagocitosis a través de los Fc γ R puede ser regulada por CR3, y a su vez la fagocitosis

mediada por CR3 puede ser regulada por los Fc γ Rs [58,73-82]. A diferencia de la modulación de la fagocitosis por los TLRs que se da al nivel de expresión de proteínas, la modulación mutua de las fagocitosis entre los Fc γ Rs y CR3 se da a nivel de señalización, como consecuencia de que comparten vías de señalización. Existe otro grupo de proteínas membranales, que no son receptores fagocíticos y que tampoco inducen programas genéticos rápidamente como los TLRs, pero que son capaces de regular la fagocitosis de los receptores fagocíticos si son ligados conjuntamente [83]. Este grupo de proteínas modulan la actividad de los receptores fagocíticos al nivel de señalización de manera positiva y negativa. Al grupo de los moduladores negativos pertenecen las *Siglecs*, *ILTs* y *SIRPs*, que poseen motivos de señalización inhibitorios (ITIMs) en su cola citoplásmica. Dentro de los moduladores positivos se encuentran las tetraspaninas, que debido a su estructura, son capaces de estabilizar agregados de receptores en la membrana, lo que es un requisito para la señalización de los receptores fagocíticos [83]. Dentro de la categoría de moduladores positivos de la fagocitosis, en trabajo previo de nuestro laboratorio se clasificó a CD13, como un modulador positivo de la fagocitosis a través del Fc γ RI, aparentemente a nivel de señalización [84].

1.2 CD13

CD13 es una ectoenzima transmembranal de la superfamilia de las gluzincinas que corta preferencialmente aminoácidos neutros en el extremo amino-terminal de sus sustratos oligopeptídicos, por lo que también es llamada Aminopeptidasa N (ANPEP o APN). CD13 es una proteína multifuncional predominantemente expresada en monocitos, macrófagos, en los epitelios renal e intestinal y en sitios de inflamación en el endotelio vascular; está involucrada en el control del crecimiento y diferenciación [85-91], regulación del tráfico celular [92-95], angiogénesis [96-98], endocitosis [99-103], adhesión [104-108] y modulación de la respuesta inmune [84,109-114]. La amplia gama de actividades biológicas de CD13 no se debe solamente al procesamiento de sus sustratos, como factores de crecimiento, neuropeptidos, citocinas, quimiocinas y péptidos vasoactivos, sino también a su capacidad de inducir señalización intracelular, independientemente de su actividad enzimática [113,115,116].

1.2.1 Estructura

CD13 pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas de zinc, es una proteína de membrana tipo II altamente glicosilada, que consta de 967 amino ácidos. CD13 se encuentra enriquecido en microdominios de membrana insolubles a detergente (DRM, Detergent Resistant Membrane) en diversos tipos celulares [99,117-119]. Se expresa como un homodímero de subunidades de 150 KDa en la superficie celular, y su dimerización ocurre en el retículo endoplásmico, previo a su glicosilación asociada a Golgi [116]. Recientemente, se obtuvo el cristal de CD13 humano, confirmando la mayoría de las predicciones estructurales previas [120]. Cada monómero de CD13 posee una región extracelular grande con diez sitios de glicosilación identificados; está organizada en cuatro dominios estructurales (I-IV) y un tallo rico en Ser/Thr, una región helical transmembranal de 32 aa, y una pequeña cola citoplásmica de 9 aa (Fig. 1A). El dominio II de CD13 posee el sitio catalítico y los motivos consenso de unión a zinc HEXXHX₁₈E y GXMEN, característicos de las metalopeptidasas M1. El sitio catalítico está rodeado por regiones de los dominios II y IV generando una cavidad interna que no es accesible a solvente, por lo que se propone que CD13 pueda asumir una conformación “cerrada” y una conformación “abierta” que exponga el sitio catalítico. La dimerización de CD13 ocurre por interacciones no covalentes entre los dominios IV de cada monómero, y dado que es una proteína tipo II anclada a la membrana, la interacción entre los dominios IV de cada monómero resulta en una estructura tipo arco en la superficie celular (Fig. 1B), con una separación de los dominios transmembranales de 54 Å (Fig. 1C). Realizando un alineamiento estructural de CD13 con la aminopeptidasa ERAP1 (*human Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1*), que presenta características estructurales similares a CD13 y que se ha mostrado que adopta una conformación cerrada (Fig. 1C) y otra abierta (Fig. 1D) [121], se modeló que la conformación abierta en ambos monómeros del dímero de CD13 resulta en un cambio conformacional grande, que ocasiona que la separación de los dominios transmembranales aumente de 54 a 102 Å (Fig. 1C-E). Este cambio conformacional podría ser la base de un evento de transducción de señales [120]. Esto implica que la unión de algunos de sus sustratos o ligandos estabilicen al dímero de CD13 ya sea en la conformación cerrada o en la conformación abierta. CD13 media la endocitosis del complejo de bradicinina y su receptor [103]. La

bradiginina es un inhibidor competitivo de CD13 [122], por lo que de acuerdo con el modelo se esperaría que la unión de bradiginina estabilizara la forma cerrada de CD13 (Fig. 1C), lo que a su vez podría ser responsable de la endocitosis del complejo bradiginina-B₂R [120]. En cambio, la unión de algunos de sus sustratos estabilizaría la conformación abierta (Fig. 1D), generando el cambio conformacional grande (Fig. 1E) mencionado.

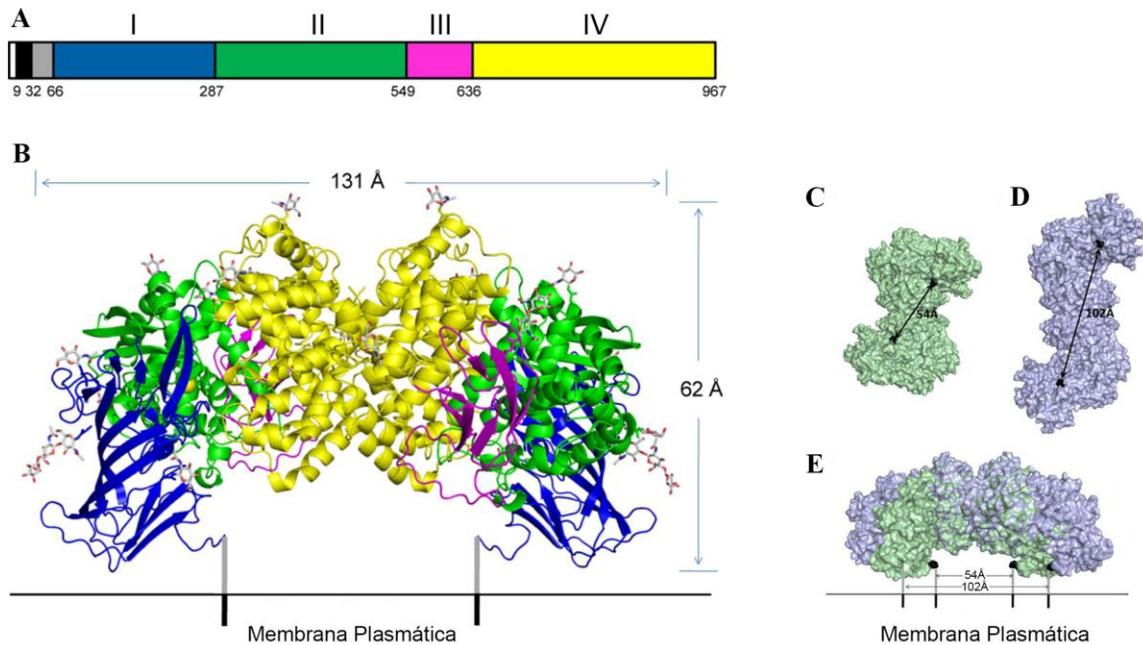


Figura 1. Estructura del dímero de CD13 humano. (A) Dominios de la cadena polipeptídica del CD13 humano. Mostrado en blanco el dominio citoplásmico, en negro el segmento transmembranal, en gris el tallo rico en Ser/Thr, los dominios I, II, III y IV mostrados en azul, verde, rosa y amarillo, respectivamente. (B) En un diagrama de listones se muestra la probable orientación de CD13 con respecto a la membrana plasmática, con los dominios coloreados como se describió en (A). (C) Representación de la superficie de CD13 visto desde la membrana con ambos monómeros en la conformación cerrada. (D) Representación de la superficie de CD13 visto desde la membrana con ambos monómeros modelados en la conformación abierta. (E) Superposición de la conformación cerrada (verde, C) y la conformación abierta de CD13 (azul, D). Modificado de Wong, et al. (2012). The Journal of biological chemistry 287, 36804-13

Este cambio conformacional inducido por la unión del sustratos es de particular significancia, ya que como se mencionó, se ha involucrado a CD13 en adhesión celular y transducción de señales, procesos que generalmente están asociados a cambios en la conformación y/o a cambios en la agregación de los receptores.

1.2.2 Funciones de CD13 dependientes de su actividad enzimática

Muchas de las funciones atribuidas a CD13 están relacionadas con su capacidad de hidrolizar a sus varios sustratos, y estas funciones dependen del tejido en donde CD13 esté expresado. Por ejemplo, en el intestino, CD13 está involucrado en la degradación terminal de péptidos para facilitar la absorción de nutrientes, y en el cerebro, CD13 corta péptidos opioides como encefalinas y endorfinas, regulando así la señalización neuronal. El espectro de sus sustratos comprende péptidos inflamatorios como fMLP, tuftsin, MCP-1 y CXCL11, péptidos vasoactivos como angiotensina III y kalidina, y péptidos de matriz extracelular [115,116,123,124]. Es claro entonces que CD13 está involucrado en la regulación de respuestas celulares mediante la activación/inactivación de los péptidos involucrados en dichas respuestas. Por pertinencia a este trabajo se describirán detalladamente solo las funciones en las que CD13 participa independientemente de su actividad enzimática.

1.2.3 Funciones de CD13 independientes de su actividad enzimática

La inhibición de la actividad enzimática de CD13 con inhibidores farmacológicos, mutaciones del sitio activo y anticuerpos inhibitorios, evidencia que existen cuando menos tres tipos de funciones mediadas por CD13 que no requieren de su actividad enzimática: i) transducción de señales, ii) endocitosis y iii) adhesión. Importantemente, todas estas funciones dependen de la agregación de CD13 en la membrana, ya sea por anticuerpos o por ligandos virales, que presumiblemente inducirían señalización. La modulación por CD13 de la fagocitosis mediada por el receptor FcγRI [84], y de la fagocitosis de receptores involucrados en la fagocitosis de zymosan y de *E. coli* [111], es el cuarto tipo de función que se discutirá en esta sección, puesto que aunque no hay datos que confirmen que no depende de la actividad enzimática de CD13, existen datos que sugieren que es una función que depende de transducción de señales mediada por CD13 [84].

1.2.3a Transducción de señales

Se ha sugerido que la transducción de señales es el mecanismo responsable de las funciones en las que CD13 está involucrado independientemente de su actividad

enzimática. La agregación de CD13 en la membrana empleando anticuerpos anti-CD13 o ligandos virales, induce eventos de señalización intracelular, como la activación de las cinasas Src, FAK, ERK y de la vía Ras/MAPK, aumento de Ca^{2+} intracelular, secreción de citocinas [108,113,125] y asociación de CD13 a fibras de actina [99,108].

En uno de los primeros trabajos en los que se atribuyó a CD13 la capacidad de mediar señalización [113], se reportó que el entrecruzamiento de CD13 en monocitos humanos de fluido pericardial y en las líneas monocíticas humanas U-937 y Mono-Mac-6, induce un aumento de Ca^{2+} intracelular sostenido, fosforilación de ERK1/2, JNK, p38 y la inducción del mRNA de IL-8. El tratamiento de las células con tapsigargina o con cafeína, un inhibidor de la liberación de calcio del retículo endoplásmico (RE) dependiente de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), resultó en el abatimiento del pico inicial de flujo de calcio en las células en las que se entrecruzó CD13, y la supresión del calcio extracelular con EGTA o el uso de medio libre de calcio, resultó en un abatimiento de la fase tardía del flujo de calcio, sin efecto en la fase inicial. Estos datos indican que el flujo de calcio inducido por la agregación de CD13 está compuesto de dos fases, una que depende de la liberación de calcio intracelular del RE y otra que depende de la entrada de calcio extracelular. La inducción inicial del flujo de calcio depende de cinasas Src, mientras que ambas fases dependen de PI3K, ya que el tratamiento de las células con PP1 inhibió solo la fase inicial, mientras que wortmanina y LY294002 inhibieron ambas fases. La fosforilación de p38 y ERK1/2, también se inhibió con PP1, wortmanina y LY294002, sugiriendo que PI3K y Src se activan como consecuencia del entrecruzamiento de CD13, y que son eventos anteriores necesarios para la fosforilación de las MAPKs y el flujo de calcio. Además, se mostró que la actividad enzimática de CD13 no está relacionada con esta señalización, ya que al usar anticuerpos que inhiben la actividad enzimática de CD13 se obtienen los mismos resultados que al usar anticuerpos que no la inhiben. Dado que CD13 posee una cola citoplásmica muy corta y sin motivos de señalización clásicos, se propuso que CD13 requeriría de una proteína auxiliar para la transducción de señales. De acuerdo con esta idea, la molécula adaptadora Grb/Sos co-immunoprecipita con CD13 en monocitos U-937, proporcionando una posible conexión entre la agregación de CD13 y la señalización de MAPK [104]. Un reporte reciente [108] mostró que CD13 está constitutivamente asociado a la proteína de andamiaje IQGAP1

(*IQ motif Ras GTPase-like-activating-protein-1*), y que tras la agregación de CD13 por anticuerpos, se recluta α -actinina al complejo CD13-IQGAP1, ligando así al CD13 de la membrana con el citoesqueleto. Este mismo estudio [108] mostró que la agregación de CD13 en células U-937, induce la fosforilación de un conjunto de proteínas y rearrreglos en el citoesqueleto de actina. En análisis más detallado de algunas de las proteínas fosforiladas, este trabajo mostró que la agregación de CD13 induce la fosforilación de FAK y Src, y comprobó la fosforilación de ERK1/2 previamente reportada. Importantemente, en este trabajo se encontró que la tirosina 6 del dominio citoplásmico de CD13 se fosforila tras la agregación de CD13 en la membrana, y que CD13 está fosforilado *in vivo* en condiciones inflamatorias en células de exudado peritoneal de animales tratados con tioglicolato. Estas observaciones sugieren una relevancia potencial *in vivo* de la fosforilación de CD13. Se mostró además que la fosforilación de CD13 en Tyr6 es dependiente de Src, puesto que el tratamiento de las células con PP2 inhibe la fosforilación en Tyr6 de CD13. De suma importancia, la fosforilación en Tyr 6 de CD13 es necesaria para la fosforilación de las cinasas FAK y ERK y para que suceda el rearrreglo de citoesqueleto de actina, ya que la sustitución de esta tirosina por una fenilalanina resulta en la inhibición de la activación de estas cinasas y del rearrreglo del citoesqueleto, lo que sugiere que la fosforilación en Tyr6 de CD13 es uno de los eventos más tempranos en la cascada de señalización inducida por la agregación de CD13. Este reporte enfatiza que, a pesar de tener una región citoplásmica corta, CD13 participa directamente en la señalización celular. En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la señalización inducida por la agregación de CD13.

1.2.3b Endocitosis

CD13 media la endocitosis de virus [99], proteínas [101], péptidos [102] y anticuerpos [99,101] en diversos tipos celulares. Las formas reportadas de endocitosis mediada por CD13 son: caveola dependiente [99,126] y clatrina dependiente [100,127]. Una de las funciones mejor caracterizadas de CD13 es su papel como receptor de coronavirus. Mediante la expresión de CD13 en células normalmente no permisivas a la infección, se ha mostrado que CD13 es el receptor de coronavirus del grupo I, dentro de los que se incluye el coronavirus humano 229E (HCoV-229E) [99,128,129], que causa

infección respiratoria aguda; y varios virus de importancia veterinaria como el coronavirus respiratorio porcino (PRCV), el coronavirus de gastroenteritis transmisible (TGEV) [100,130,131], el coronavirus felino (FCoV) [132], y el coronavirus canino (CCoV) [133]. En la mayoría de los casos, los coronavirus del grupo I infectan de manera especie-específica y se ha mostrado que las diferencias en la glicosilación de CD13 de las distintas especies [134], es uno de los determinantes de esta especificidad. El uso de inhibidores de la actividad enzimática y mutaciones en el sitio activo, han mostrado que infección del virus no depende de la actividad enzimática de CD13 [128,133,134]. La infección del virus sucede por endocitosis mediada por CD13, ya que el tratamiento de las células con inhibidores de endocitosis como bafilomicina-1 y cloruro de amonio impiden la infección [100]. En el caso de la infección con HCoV-229E, la entrada del virus es por endocitosis mediada por caveolas, ya que la disminución de la expresión de caveolina-1 empleando RNAi, en células normalmente susceptibles a la infección, resulta en una inhibición de la infección [99]. Importantly, este mismo trabajo mostró que la adición de las partículas virales HCoV-229E, induce la agregación de CD13 en la membrana, que resulta en la formación de fibras de actina longitudinales, y que la agregación de CD13 empleando anticuerpos anti-CD13 presenta las mismas consecuencias que la agregación de CD13 inducida por HCoV-229E (Fig. 2B).

CD13 es también receptor para el citomegalovirus humano (hCMV) [125,135,136], puesto que se ha mostrado que dentro de las células mononucleares de sangre periférica humana, las células CD13⁺ son las únicas susceptibles de infección; además, la infección de las células por hCMV se bloquea tras el tratamiento con anticuerpos anti-CD13. A diferencia del caso de los coronavirus, el bloqueo de la actividad enzimática de CD13 con bestatina, inhibe la infección pero no la unión del virus [136]. La unión del hCMV a monocitos, induce un aumento de calcio intracelular que resulta en la inhibición de la diferenciación de monocito a macrófago, y se ha mostrado que este bloqueo de la diferenciación a macrófagos depende de la unión del virus a CD13 independientemente de su actividad enzimática, ya que el tratamiento de los monocitos con bestatina, no inhibe el aumento de calcio intracelular ni el bloqueo de la diferenciación como resultado de la unión del hCMV a CD13 [125]. De manera interesante, este mismo trabajo mostró que el tratamiento de los monocitos con

anticuerpos anti-CD13 induce un aumento de calcio intracelular similar al inducido por la unión de hCMV, y también resulta en la inhibición de monocito a macrófago, apoyando la idea de que la agregación de CD13 induce señalización, y que el uso de anticuerpos refleja las consecuencias funcionales de la unión de un ligando polivalente natural (Fig. 2B) [99,125].

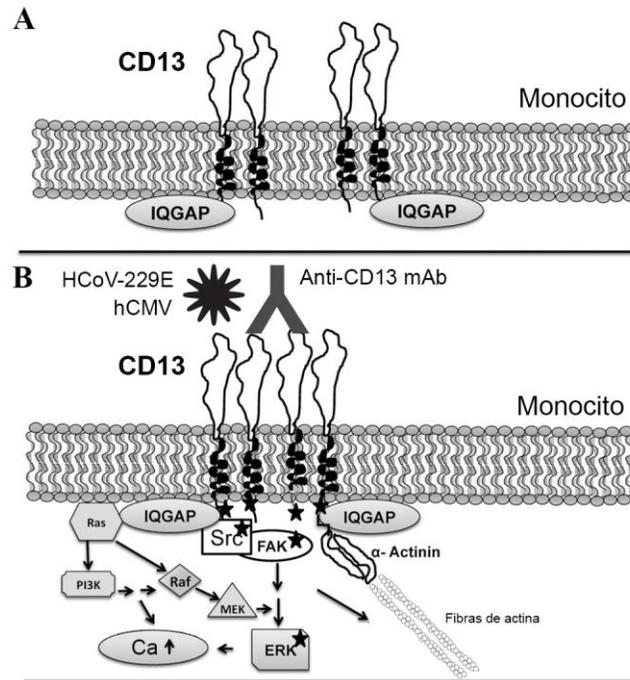


Figura 2. Vías de señalización inducidas por la agregación de CD13. Representación esquemática de la señalización inducida por la agregación de CD13. (A) En células monocíticas en reposo, CD13 se encuentra asociado a IQGAP1. (B) El entrecruzamiento de CD13 por anticuerpos anti-CD13 induce la agregación de CD13 en la membrana, activación de Src, fosforilación de CD13 en la Tyr6, activación de las cinasas FAK y ERK, y la formación de complejos entre α -actinina y CD13, la activación de PI3K y de componentes de la vía Ras/MAPK y aumento de calcio intracelular. La interacción de CD13 con sus ligandos virales (HCoV-229E y hCMV) induce la agregación de CD13 en la membrana, la formación de fibras de actina y aumento de calcio intracelular. Modificado de Subramani, et al. (2013). *J Immunol* 191, 3905-12.

1.2.3c Adhesión

Trabajo pionero de nuestro laboratorio, junto con el trabajo posterior de otros grupos, ha mostrado que CD13 media adhesión celular homotípica y heterotípica *in vitro* e *in vivo*, de manera dependiente de cinasas de tirosina [95,104-108]. El entrecruzamiento de CD13 en células U-937 induce la formación de agregados estables de células (agregación homotípica) [104]. El fenómeno de agregación celular mediado por el entrecruzamiento de CD13 es dependiente de tiempo, con la aparición de pequeños agregados a partir de los 15 min, llegando a una agregación del 80% de las células a las 4

horas, y que alcanza su efecto máximo a las 24 horas. Esta agregación no depende de la actividad enzimática de CD13 puesto que el tratamiento de las células con bestatina o con anticuerpos anti-CD13 que inhiben su actividad enzimática, no inhibe la agregación. La agregación homotípica mediada por CD13 depende de señalización, ya que la inhibición farmacológica de Src, MAPKs, PI3K y PKC abate la agregación. Durante la agregación homotípica, CD13 se distribuye a las zonas de contacto célula-célula, lo que sugiere que CD13 tiene un papel activo en este fenómeno [104]. CD13 también está involucrado en adhesión heterotípica [105]; cuando CD13 se entrecruza con anticuerpos en células U-937 y éstas se ponen en contacto con monocapas de células endoteliales, se induce una mayor adhesión (de 8 a 10 veces mayor) de los monocitos tratados con anticuerpos anti-CD13 (“monocitos activados”) comparados con los monocitos no tratados (no activados) a la monocapa de células endoteliales. El uso de monocapas de células endoteliales que no expresan CD13 mostró que es necesaria la expresión mutua de CD13 para que suceda la adhesión, puesto que los “monocitos activados” no se adhieren a monocapas de células endoteliales que no expresan CD13. La adhesión heterotípica depende de señalización por cinasas de tirosina y de rearrreglos del citoesqueleto de actina, ya que el tratamiento de las células con herbimicina o citocalasina-D impide la adhesión. Estos datos están de acuerdo con los datos de la señalización inducida por el entrecruzamiento de CD13 [108,113] y con la agregación homotípica mediada por CD13 [104]. La adhesión heterotípica tampoco depende de la actividad enzimática de CD13, ya que un panel de anticuerpos que inhiben en distinto grado la actividad enzimática de CD13 son capaces de inducir esta adhesión. De relevancia, la utilización de distintos anticuerpos anti-CD13, que se unen a distintos epítomos de CD13 demostraron que la adhesión no depende de la unión de los anticuerpos a un epítomo específico de la molécula de CD13, sino más bien a la agregación de CD13 en la membrana por estos anticuerpos, puesto que ninguno de los fragmentos Fab de los diferentes anticuerpos anti-CD13 induce adhesión, sin embargo, la adición de un anticuerpo secundario –capaz de inducir agregación- a las células tratadas con los fragmentos Fab anti-CD13, restituye la adhesión. Se empleó un segundo enfoque para demostrar que la agregación de CD13 en la membrana es el mecanismo responsable de la señalización que resulta en adhesión: empleando una proteína quimérica CD13-V5, se indujo agregación de CD13 con anticuerpos anti-V5 y se encontró que se induce el

mismo grado de adhesión que cuando se emplean anticuerpos anti-CD13. Estos datos indican que la agregación de CD13 en la membrana es un requisito indispensable para la inducción de la señalización necesaria para la adhesión [105]. Finalmente, se mostró recientemente que la adhesión de monocitos a monocapas de células endoteliales mediada por CD13 depende de la fosforilación de la tirosina 6 de la cola citoplásmica CD13, de Src, FAK y ERK [108]. La sustitución de Tyr6 por una fenilalanina (Y6F), o la inhibición farmacológica de Src, FAK o ERK, resulta en la inhibición de la adhesión de monocitos a células endoteliales *in vitro*. En experimentos *in vivo* empleando un modelo de inflamación peritoneal inducida por tioglicolato, se transfirió igual número de monocitos CD13-wt o CD13-Y6F, y se encontró que los monocitos CD13-wt se infiltran a la cavidad peritoneal mientras que los monocitos CD13-Y6F no se infiltran, lo que sugiere que la fosforilación en la Tyr6 de CD13 es un evento esencial durante la adhesión y/o tráfico a sitios de inflamación *in vivo* [108].

1.2 3d Modulación de la fagocitosis mediada por otros receptores fagocíticos

La fagocitosis comparte mecanismos bioquímicos con la adhesión y la migración, ya que todos estos procesos requieren de la reorganización coordinada del citoesqueleto. De hecho, existen muchos ejemplos de moléculas de membrana que funcionan como moléculas de adhesión y como receptores fagocíticos, dentro de las que se encuentran CR3, CD44, CD36, la integrina $\alpha_v\beta_3$, entre otras. El primer indicio de que CD13 podría estar involucrado en fagocitosis surgió de un estudio en el que se describió una correlación positiva entre la expresión de CD13 y la fagocitosis de microesferas de látex en macrófagos derivados de monocitos humanos diferenciados con 1,25-dihidroxy vitamina D₃ [137], lo que sugirió que CD13 podría modular la capacidad fagocítica de los receptores involucrados en la fagocitosis de las microesferas. A este respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado una interacción funcional entre CD13 y Fc γ RI [84], y entre CD13 y receptores involucrados en la fagocitosis de zymosan y *E. coli* [111]. Se mostró que CD13 y el Fc γ RI se co-redistribuyen en la membrana, mostrando co-localización. En células U-937 en reposo, Fc γ RI y CD13 presentan una distribución uniforme en la membrana, sin embargo cuando se entrecruza al Fc γ RI, CD13 se redistribuye a las mismas zonas de la membrana; y al entrecruzar a CD13, el Fc γ RI se

distribuye a la misma zona de la membrana [84]. Esta co-redistribución se comprobó en un reporte simultáneo de otro grupo, en el que se mostró que CD13 se co-localiza a la misma zona de la membrana que los Fc γ RI y Fc γ RII como resultado de la agregación de estos receptores [138]. Estos datos sugirieron que podría haber una interacción funcional entre CD13 y los Fc γ Rs, como miembros de un complejo que funcionara como un receptor multimérico. Nuestro trabajo previo [84] mostró también que en células U-937 y en monocitos humanos de sangre periférica, durante la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG, mediada por los Fc γ Rs, CD13 se re-distribuye a las zonas de interacción célula-partícula y es internalizado al fagosoma. Dada la selectividad de moléculas presentes en la copa fagocítica, este dato reforzó la noción de que CD13 podría tener un papel en la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs. Esta hipótesis se comprobó, ya que la interacción simultánea del Fc γ RI y CD13 con partículas fagocitables, resulta en una fagocitosis mayor (220%) que la fagocitosis resultante de la interacción de las partículas con Fc γ RI solamente. Se sugirió que esta modulación positiva de la fagocitosis por Fc γ RI, es resultado de una regulación mediada por CD13 de las vías de señalización requeridas para la fagocitosis, ya que se encontró que el entrecruzamiento simultáneo de Fc γ RI y CD13 aumenta el nivel y la duración de la fosforilación de Syk, comparado con la fosforilación de Syk inducida por la agregación del Fc γ RI solamente. En otro trabajo de nuestro grupo [111], se mostró que la agregación de CD13 modula positivamente la fagocitosis de zymosan y *E. coli* inactivadas por calor, en células dendríticas y en macrófagos derivados de sangre periférica humana. Además se encontró que CD13 se localiza en la membrana fagosomal después de la fagocitosis de zymosan. En conjunto, estos datos postulan a CD13 como un regulador más universal de la fagocitosis, ya que puede modular la fagocitosis a través del Fc γ RI y de otros receptores fagocíticos, como receptores de β -glucano, receptores scavenger y el receptor de C5a, que se ha sugerido que participan en la fagocitosis de zymosan y *E.coli* [29,139,140].

Esta modulación general de la fagocitosis sugiere que CD13 podría regular la actividad de estos y otros receptores fagocíticos con los que comparte vías de señalización como Src, FAK, ERK, PI3K, MAPKs, aumento de Ca²⁺ intracelular y re-arreglos del citoesqueleto de actina. Y sugiere también que, dado que CD13 puede activar

las vías de señalización requeridas para la fagocitosis, el entrecruzamiento de CD13 podría inducir también fagocitosis. Existen muchos ejemplos de modulación de la fagocitosis entre receptores fagocíticos, como CR3 y los Fc γ Rs, los Fc γ Rs y Dectina-2 [141], integrinas y TIM-4 [9], los Fc γ Rs y CD36 [142], CD44 y CR3 [38], entre otros. La cooperación entre los Fc γ Rs y CR3 es la más caracterizada, y existe amplia evidencia de que la señalización a través de CR3 modula la señalización a través de los Fc γ Rs [58,73-82]. La presencia de C3, reduce significativamente la cantidad de IgG requerida para inducir internalización de partículas mediada por los Fc γ Rs en monocitos [74,76]; el bloqueo de CR3 con anticuerpos reduce la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs sin afectar la unión de la partículas opsonizadas con IgG a los Fc γ Rs [73]; y la co-expresión de CR3 con una mutante de Fc γ RIIA que carece de la cola citoplásmica, restituye la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG [81]. También se ha descrito que la estimulación de los Fc γ Rs afecta la función de CR3 [79]. La agregación los Fc γ Rs con eritrocitos opsonizados con IgG en la línea murina RAW264.7 estimula la adhesión de los macrófagos a superficies cubiertas con ligandos de CR3, y aumenta la unión de partículas opsonizadas con C3bi a CR3, lo que indica que CR3 se activa en respuesta a la estimulación de los Fc γ Rs. Además, se induce la movilización de CR3 a la copa fagocítica que contiene a los Fc γ Rs y a las partículas opsonizadas con IgG [79], de manera análoga a lo observado en nuestro trabajo en donde CD13 se moviliza a la copa fagocítica durante la fagocitosis a través de los Fc γ Rs [84]. Todos estos datos nos sugirieron que CD13 podría no sólo ser un modulador positivo de la fagocitosis, sino un receptor fagocítico primario. Apoyando esta idea, datos de nuestros trabajos previos sugerían que CD13 podría inducir internalización de partículas en células U-937 y en monocitos y células dendríticas, aunque está posibilidad no se había explorado a detalle previamente. Por tanto, se decidió determinar conclusivamente si CD13 puede funcionar como un receptor fagocítico primario en monocitos y macrófagos.

2. HIPÓTESIS

CD13 es un receptor fagocítico primario en monocitos y macrófagos humanos

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si CD13 es un receptor fagocítico primario en monocitos humanos y caracterizar las vías de señalización requeridas para la fagocitosis mediada por CD13.

3.1 Objetivos particulares

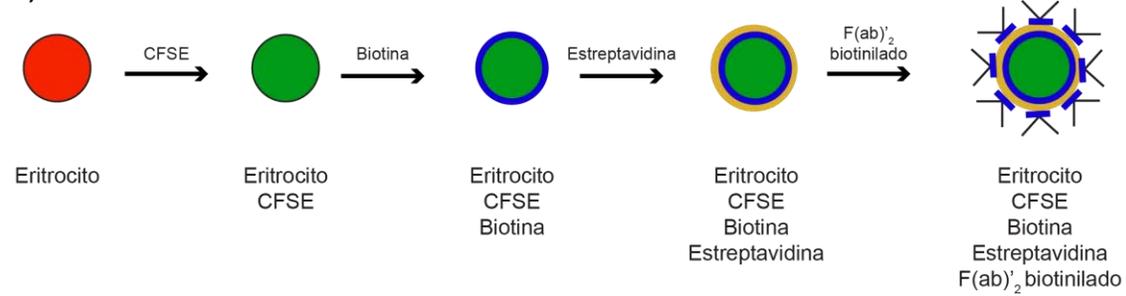
1. Determinar si la interacción de partículas fagocitables exclusivamente con CD13 resulta en la internalización de las partículas por fagocitosis.
2. Caracterizar las rutas bioquímicas involucradas en la internalización de partículas mediada por CD13.
3. Determinar si la fagocitosis mediada por CD13 es dependiente de su actividad de aminopeptidasa.
4. Inducir la expresión heteróloga de CD13 para demostrar su función como un receptor fagocítico.
5. Investigar si la señalización mediada por CD13 resulta producción de especies reactivas de oxígeno.
6. Investigar si CD13 además de modular la fagocitosis a través del FcγRI, CD13 puede modular la actividad de CR3.

4. RESULTADOS

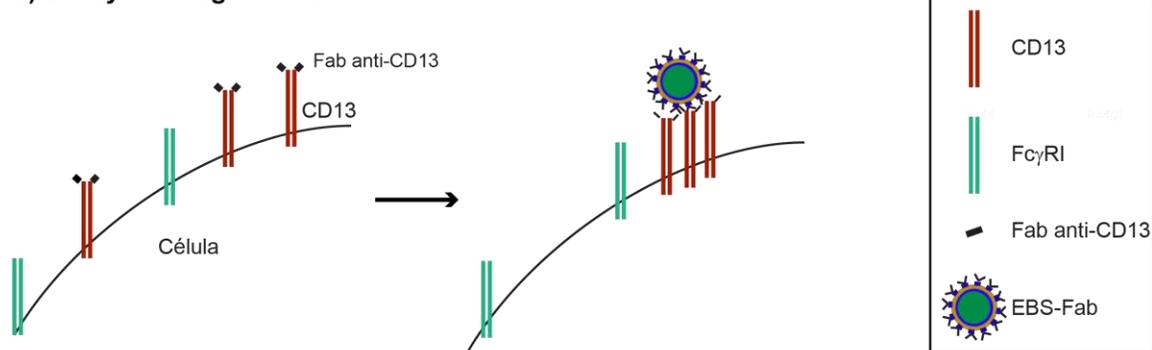
4.1 Construcción de las partículas fagocitables y ensayo de fagocitosis específica

Para investigar si CD13 es capaz de mediar fagocitosis independientemente de otros receptores fagocíticos, se empleó un sistema experimental para dirigir eritrocitos de carnero (como partícula fagocitable) a receptores individuales en la célula, basado en el uso de anticuerpos, como ha sido reportado previamente [22,84,143]. Los eritrocitos de carnero fueron marcados con CFSE, posteriormente se cubrieron progresivamente con biotina, estreptavidina y finalmente con fragmentos F(ab)₂ de IgG de cabra-anti-IgG de ratón biotinilados (Fig. 3A), denominamos a estas partículas EBS-Fabs (por sus siglas en inglés: Erythrocyte Biotin Streptavidin- Fab). Así, al poner los EBS-Fabs en contacto con las células, estos interactuarán solamente con moléculas en la superficie celular previamente marcadas con anticuerpos de ratón específicos para la molécula seleccionada, por lo que este sistema es llamado fagocitosis selectiva (Fig. 3B). Debido a que la especificidad del sistema está basada en el uso de anticuerpos, se emplearon los fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón-anti-receptores de células humanas, para marcar a las células y así excluir la participación de los FcγRs en la fagocitosis. Para los ensayos de fagocitosis, las células se pre-incubaron con: fragmentos Fab del mAb452 anti-CD13 (Fab452), o con fragmentos Fab del mAb32.2 anti-FcγRI (Fab32.2), o con un control de isotipo (IgG1 de ratón), o sin tratamiento (fagocitosis basal, No Fab). Las células se lavaron y mezclaron con los EBS-Fabs y se incubaron a 37°C o 4°C por los periodos de tiempo indicados (Fig. 3B). Después de la incubación, los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico. El porcentaje de células que internalizaron cuando menos un EBS-Fab (células CFSE-positivas) se determinó por citometría de flujo en presencia de Azul Trypano para apagar cualquier fluorescencia extracelular (Fig. 3C).

A) Construcción de EBS-Fabs



B) Ensayo de Fagocitosis Selectiva



C) Cuantificación por citometría de flujo

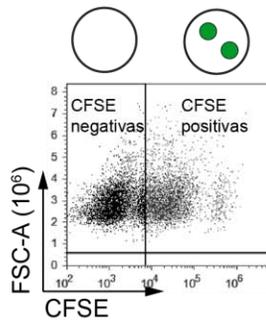


Figura 3. Representación esquemática de los ensayos de fagocitosis selectiva a través de CD13. (A) Construcción de EBS-Fabs: los eritrocitos de carnero fueron marcados con CFSE, posteriormente se cubrieron progresivamente con biotina, estreptavidina y finalmente con fragmentos F(ab)₂ de IgG de cabra-anti-IgG de ratón biotinilados. (B) Los monocitos fueron incubados con Fragmentos Fab del mAb murino 452 anti-CD13 (Fab452), posteriormente se lavaron y mezclaron con los EBS-Fabs y se incubaron a 37°C ó 4°C por los periodos de tiempo indicados. Los eritrocitos que no fueron internalizados se lisaron por choque hipotónico. (C) El porcentaje de células que internalizaron cuando menos un EBS-Fab se cuantificó por citometría de flujo.

4.2 CD13 media la internalización de EBS-Fabs en células THP-1

Inicialmente exploramos si la ligación de los EBS-Fabs a través de CD13, es capaz de inducir la internalización de estas partículas en células THP-1. Encontramos que la ligación de los EBS-Fabs por CD13 induce una internalización eficiente de la partícula fagocitable. En la figura 4A, se muestra un análisis de citometría en gráfico de puntos

representativo de estos experimentos (*dot-plot*), y en la figura 4B se muestra la media del porcentaje de internalización encontrado. La internalización de EBS-Fabs mediada por CD13 (media 28.5%) (Fig. 4B, n=25) es estadísticamente significativa comparada con el control de isotipo (media 2.5%) o con las células sin tratamiento (No Fab, media 3.6%, fagocitosis basal). Como control positivo del experimento, se midió la fagocitosis selectiva a través del receptor de alta afinidad Fc γ RI (media 33.5%). No encontramos internalización cuando muestras idénticas se incubaron a 4°C (Fig. 4A, paneles inferiores), lo que sugiere que el proceso de internalización de partículas y la cuantificación de la fagocitosis en nuestro sistema, no es el resultado de difusión del fluoróforo presente en las partículas hacia las células o de la presencia de partículas fagocitables unidas a la superficie celular.

El porcentaje de células que internalizan EBS-Fabs a través de CD13 (media 28.5%) es ligeramente inferior que el porcentaje de células que internalizan eritrocitos a través de Fc γ RI (media 33.5%). Dado que la interacción de la partícula con el receptor específico, en nuestro sistema, está basada en la unión de anticuerpos, la menor fagocitosis a través de CD13 podría ser consecuencia de una menor unión de los Fabs anti-CD13 comparada con la unión de los Fabs anti-Fc γ RI a las células THP-1. Exploramos la unión de estos Fabs a las concentraciones empleadas en los experimentos de fagocitosis y encontramos que los fragmentos Fab anti-CD13 y los fragmentos Fab anti-Fc γ RI muestran similares niveles de unión a las células THP-1 (Fig. 4C). Este resultado sugiere que las diferencias en el grado de internalización inducido por los dos receptores es intrínseco.

Usualmente se emplean dos tipos de cuantificación para evaluar los ensayos de fagocitosis: 1) el porcentaje de células fagocíticas, que indica la proporción de la población celular que internaliza cuando menos una partícula fagocítica, y 2) el índice fagocítico (PI, por sus siglas en inglés *Phagocytic Index*), que es una medida del número de partículas que son internalizadas por célula. Cuando comparamos el índice fagocítico (PI= % Células CFSE-positivas multiplicado por la intensidad media de fluorescencia, relativo al control), encontramos resultados similares a aquellos comparando el porcentaje de células CFSE-positivas. La media de PI de la internalización mediada por

CD13 (Fig. 4D, PI=10.3, n=25) es ligeramente menor que la media del PI de la

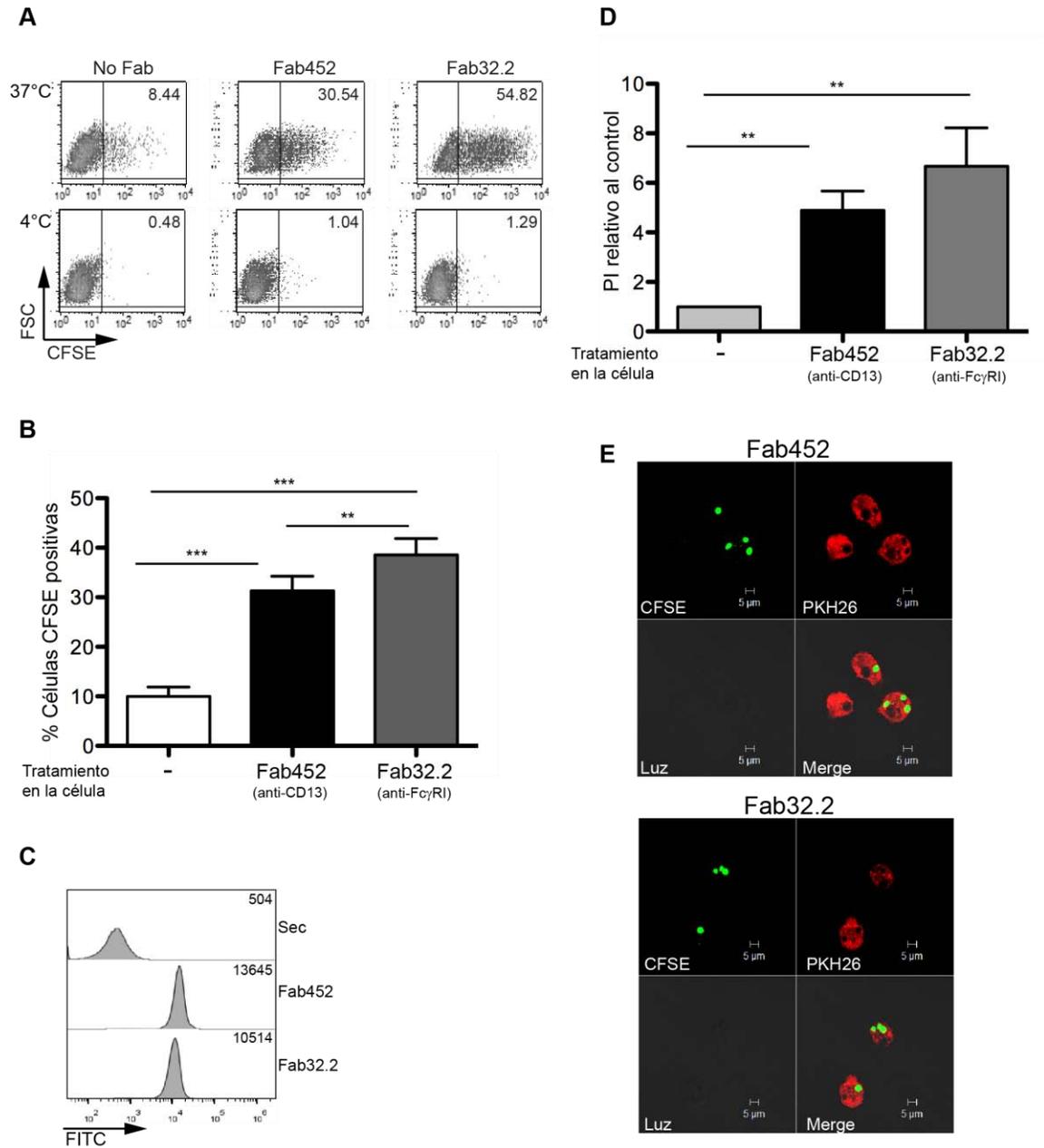


Figura 4. CD13 media la internalización de partículas en células THP-1. Células THP-1 se incubaron con 2 µg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 µg de de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI), 8 µg de IgG1 o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Posteriormente la células fueron lavadas e incubadas con los EBS-Fabs por 105 min a 37°C ó 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (A) Gráfica de puntos representativa de un experimento. (B) Promedio de células CFSE positivas de 25 experimentos independientes (C) Unión de 2 µg de Fab452 o de 8 µg de Fab32.2 a las células THP-1. (D) Promedio de Índice Fagocítico de 25 experimentos independientes. (E) Imagen representativa de la fagocitosis en células teñidas con DiI (rojo) e incubadas con los EBS-Fabs (verde). ***p<0.0001, **p<0.005 *p<0.05

fagocitosis mediada por el FcγRI (PI=11.3). Aunque consistentemente la internalización mediada por el receptor fagocítico canónico FcγRI es mayor, la fagocitosis a través de

CD13 es competente, ya que alcanza más del 85% de la fagocitosis mediada por el Fc γ RI, comparando ya sea el porcentaje de células positivas o el índice fagocítico.

Para comprobar que la fluorescencia asociada a la célula representa verdaderamente a los EBS-Fabs internalizados, verificamos la internalización de la partícula por microscopía confocal. En la figura 4E se muestra una imagen de microscopía confocal representativa. En esta figura, se observa que el número de partículas internalizadas por célula es similar después de la internalización mediada a través de CD13 (Fig. 4E, paneles superiores) o a través del Fc γ RI (Fig. 4E, paneles inferiores), lo cual concuerda con el análisis del índice fagocítico. De gran relevancia para este estudio, las partículas visualizadas dentro de las células después de la internalización mediada por CD13 o por el Fc γ RI miden alrededor de 4 μ m, lo cual excluye otras formas de internalización como endocitosis mediada por caveolas (caracterizada por pequeñas vesículas de 50-80 nm) o endocitosis mediada por clatrina (caracterizada por vesículas de \approx 100 nm). En conjunto, estos datos indican que CD13 es capaz de mediar la fagocitosis de partículas grandes (de más de 4 μ m) en células THP-1.

4.3 CD13 media fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDMs)

Para investigar si la internalización de partículas grandes mediada por CD13 observada en las células THP-1 constituye un fenómeno específico de esta línea celular o si es un fenómeno general de las células fagocíticas, realizamos experimentos de fagocitosis selectiva en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (hMDMs). Encontramos resultados análogos a los encontrados en las células THP-1 (Fig. 5A), ya que la ligación de CD13 por los EBS-Fabs resulta en una internalización significativa de la partícula (Fig. 5B, media 31.3%, n=14) comparada con la fagocitosis basal (Fig. 5B, media 9.9%, n=14). Comparable también a lo observado en las células THP-1, la fagocitosis mediada por CD13 es menor que la fagocitosis mediada por el Fc γ RI (Fig. 5B, media 38.5%, n=14). No se observó internalización de EBS-Fabs cuando muestras idénticas fueron incubadas a 4°C (Figura 5A, paneles inferiores). La media del

índice fagocítico mediado por CD13 (Fig. 5D, PI = 4.9, n=14) también es menor que la

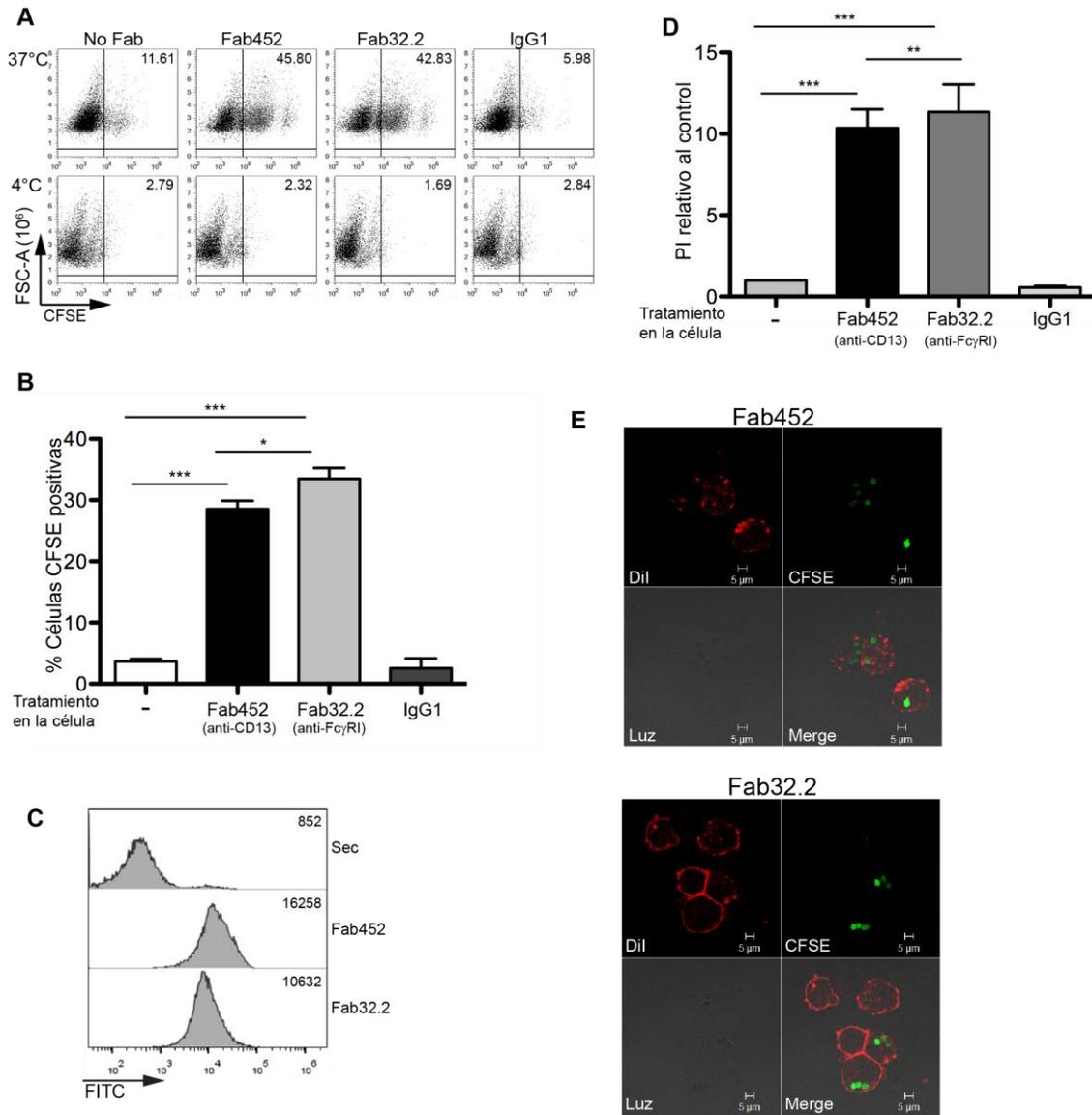


Figura 5. CD13 media la internalización de partículas en hMDMs. hMDMs incubaron con 2 µg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 µg de de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Posteriormente la células fueron lavadas e incubadas con los EBS-Fabs por 45 min a 37°C ó 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (A) Gráfica de puntos representativa de un experimento. (B) Promedio de células CFSE positivas de 17 experimentos y donadores independientes (C) Unión de 2 µg de Fab452 o de 8 µg de Fab32.2 a los hMDMs. (D) Promedio de Índice Fagocítico de 17 experimentos independientes (E) Imagen representativa de la fagocitosis en hMDMs marcados con PKH-26 (rojo) e incubadas con los EBS-Fabs (verde). ***p<0.0001, **p<0.005.

media del índice fagocítico mediado por el FcγRI (Fig. 5D, PI = 6.6, n=14). En los hMDMs, al igual que en la línea celular THP-1, esto no es resultado de menor unión de los Fabs a CD13 comparado con la unión de los Fabs al FcγRI, ya que los fragmentos anti-CD13 y los fragmentos anti-FcγRI muestran niveles de unión similares en los

hMDMs, a las concentraciones utilizadas en estos experimentos (Fig. 5C). Semejante a lo observado en las células THP-1, aunque la fagocitosis a través del receptor fagocítico canónico es mayor en los hMDMs, la fagocitosis a través de CD13 es competente, ya que alcanza casi el 80% de la fagocitosis mediada por el Fc γ RI, comparando ya sea el porcentaje de células positivas o el índice fagocítico.

En los hMDMs también verificamos la internalización de la partícula por microscopía confocal (Fig. 5E). El número de partículas internalizadas por célula, es similar después de la internalización mediada a través de CD13 (Fig. 5E, paneles superiores) o de Fc γ RI (Fig. 5E, paneles inferiores), acorde con el análisis del índice fagocítico. Se observa también que las partículas internalizadas son de alrededor de 4 μ m, lo que sugiere que se trata de fagocitosis y no de otras formas de internalización. En conjunto, estos datos indican que CD13 es capaz de mediar fagocitosis de partículas grandes (más de 4 μ m) en hMDMs, y sugiere que la internalización de partículas a través de CD13 no es un fenómeno particular de una línea celular.

4.4 Fagocitosis en células deficientes de CD13

Para demostrar que la fagocitosis de EBS-Fabs observada en nuestro sistema es consecuencia de la interacción de las partículas solamente con CD13, y excluir formalmente la posibilidad de que los fragmentos Fab del mAb 452 se estuvieran uniendo a proteínas de la membrana diferentes a CD13, generamos una sub-línea de células THP-1 estable, con una expresión muy reducida de CD13, empleando RNA de interferencia (RNAi). Se emplearon 5 secuencias anti-sentido para diferentes regiones del mRNA de CD13 (siL1-siL5) y una secuencia anti-sentido para GFP, clonados en el vector de expresión lentiviral (Fig. M1, Sección Materiales y Métodos). Infectamos células THP-1 con las partículas lentivirales que contenían cada una de las 5 distintas secuencias de shRNAs anti-CD13 (L1-L5) o un shRNA anti-GFP (C+). Las células transducidas con las partículas lentivirales L2 mostraron una mayor reducción de la expresión de CD13, comparadas con las células infectadas con el resto de los lentivirus o con la línea parental (Fig. 6A). Las secuencias contenidas en las partículas lentivirales L1 y L5 no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de CD13 (Fig. 6C); mientras que las secuencias

contenidas en las partículas lentivirales L3 y L4 redujeron la expresión de CD13 en las células pero a un nivel menor que la secuencia L2 (Fig. 6B). Por lo tanto, escogimos a las células transducidas con las partículas lentivirales L2 para los experimentos posteriores (referidas como L2 en adelante).

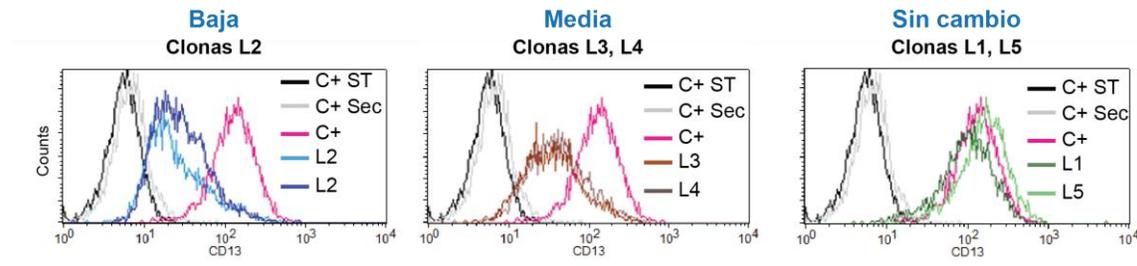


Figura 6. Expresión de CD13 en las células transducidas con los distintos lentivirus. Las células transducidas con las partículas lentivirales que contenían cada una de las 5 secuencias de shRNA anti-CD13 (L1 a L5) o un shRNA anti-GFP (C+) se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13) por 30 min a 4°C, las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC y analizadas por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de estos experimentos.

Las células L2, mostraron una reducción de alrededor del 80% en la expresión de CD13 en la membrana comparada con la línea parental (THP-1), medido por citometría de flujo (Fig. 7A). En contraste, las células transducidas con las partículas lentivirales control (shRNA anti-GFP, designadas como C+) no mostraron cambios en la expresión de CD13 comparadas con la línea parental (Fig. 7A). También analizamos la expresión de Fc γ RI en estas células y encontramos un pequeño incremento en la expresión de Fc γ RI en las células L2 comparadas con las células C+ o con la línea parental (Fig. 7A), lo cual puede ser resultado de la integración aleatoria de la secuencia de interferencia, o por interacciones de CD13 y Fc γ RI no descritas en la literatura, aunque creemos que éste no es el caso dado que también obtuvimos clonas estables con menor expresión de CD13 y menor expresión de Fc γ RI (Fig. 8B). No observamos otro cambio fenotípico o morfológico entre las células CD13 deficientes (L2), las células control (C+) y la línea parental.

Cuando las células de la línea parental THP-1, las células control (C+) o las células CD13-deficientes (L2) fueron tratadas con Fab452 e incubadas con los EBS-Fabs, no se encontró internalización significativa de EBS-Fabs en las células L2, en contraste con la internalización observada en las células C+ o la línea parental (Fig. 7B-C, n=7).

De manera notable, la fagocitosis de los EBS-Fabs a través del Fc γ RI no se afectó en las

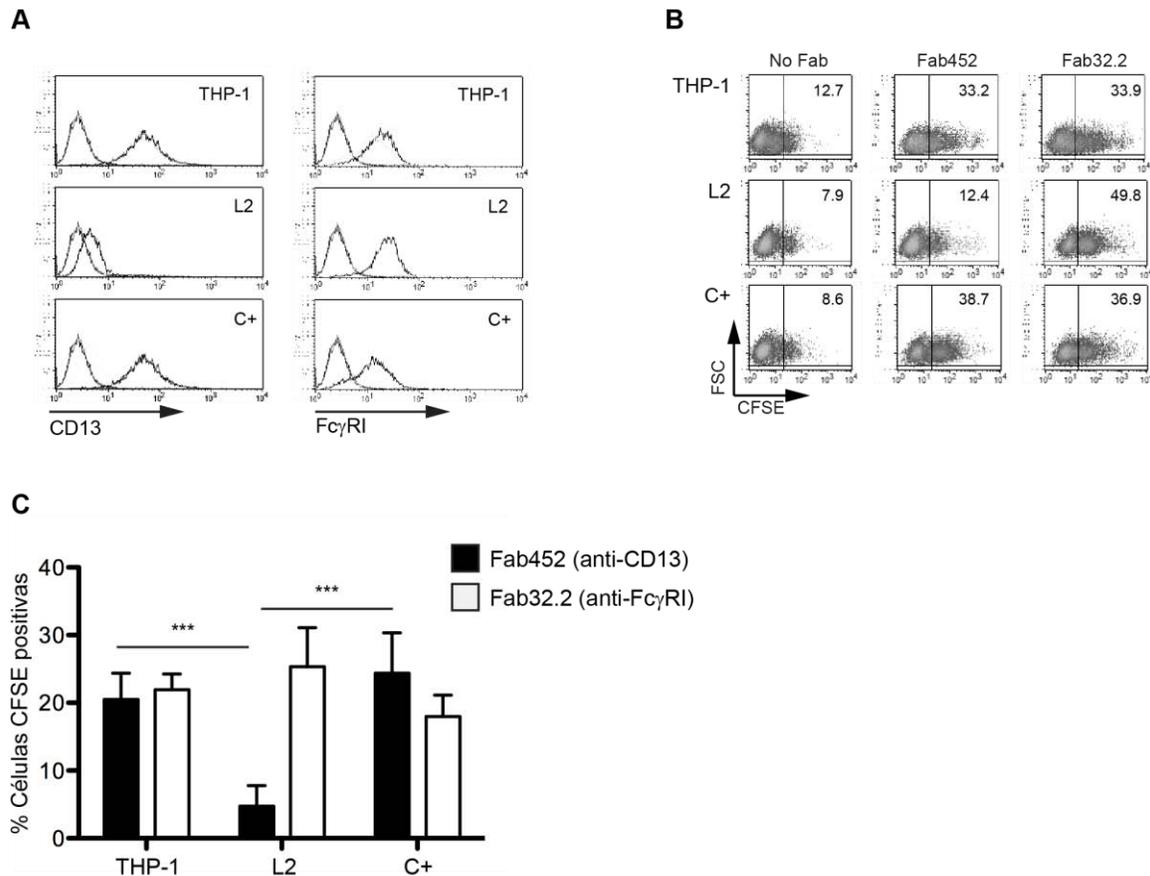


Figura 7. Fagocitosis selectiva en células CD13-deficientes. Células THP-1, L2 y C+ se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 μ g de de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Posteriormente la células fueron lavadas e incubadas con los EBS-Fabs por 105 min a 37°C ó 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (A) La expresión de CD13 y Fc γ RI se determinó por citometría de flujo en células THP-1, L2 o C+, se presenta un histograma representativo. (B) Gráfica de puntos representativa de un experimento. (C) Promedio de células CFSE positivas de 7 experimentos independientes ***p<0.0005

células CD13-deficientes (L2), demostrando que estas células son fagocitos competentes. El aumento en la fagocitosis a través del Fc γ RI en las células L2 comparado con las células control no es estadísticamente significativo, y podría ser explicado por el hecho de que la expresión del Fc γ RI es más alta en las células L2 (Fig. 7A). Estos resultados concuerdan con un trabajo reciente en ratones deficientes de CD13 (CD13 null), en donde se muestra que la fagocitosis a través de los Fc γ Rs no se afecta en ausencia de CD13 [144]. Sin embargo, es importante subrayar que aunque la ausencia de CD13 no disminuye la fagocitosis a través del Fc γ RI, la agregación simultánea de CD13 con el Fc γ RI, sí regula positivamente la fagocitosis, como se reportó previamente [84].

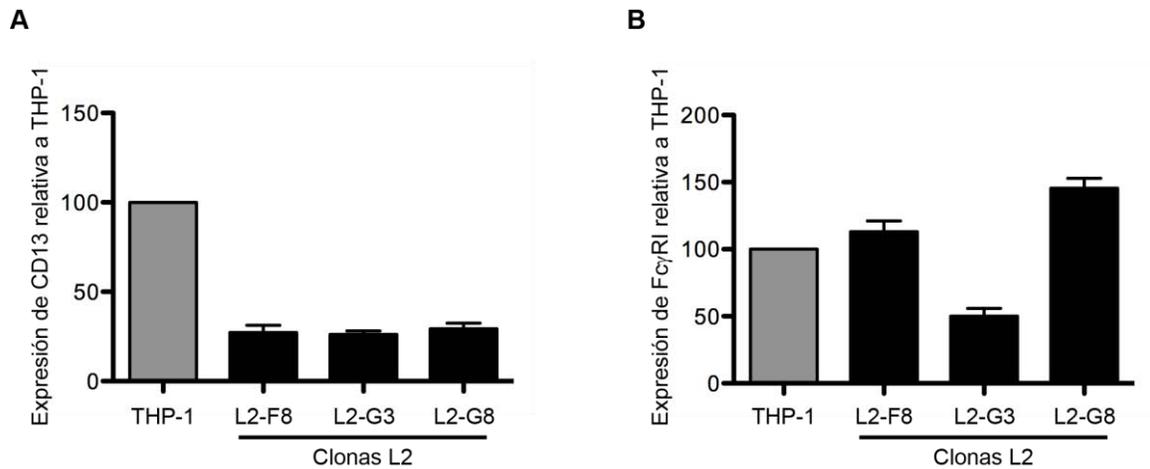


Figura 8. Expresión de CD13 y FcγRI en clones L2. Células THP-1 y las clones L2 se incubaron con 2 μg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13) o con 8 μg de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI) por 30 min a 4°C, las células se lavaron e incubaron con anticuerpo secundario conjugado a FITC y se analizaron por citometría. Se muestra el promedio de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 4 experimentos independientes normalizados con respecto a las células parentales THP-1. (A) Expresión de CD13. (B) Expresión del FcγRI.

El experimento mostrado en la figura 7 confirma que la fagocitosis de EBS-Fabs a través de CD13 observada en las figuras 4 y 5 es realmente mediada por CD13, ya que aunque las células L2 expresan FcγRI y FcγRII, entre otros receptores fagocíticos, estas células no internalizan EBS-Fabs cuando se emplea el Fab-anti-CD13. Estos resultados sustentan que la partícula fagocitable se une exclusivamente a CD13, y que esta unión induce la internalización de la partícula a través de CD13.

4.5 La fagocitosis mediada por CD13 depende del citoesqueleto de actina

La internalización de partículas a través de todos los receptores fagocíticos *bona fide* requiere de una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina [1,4,40,145], de tal manera que la dependencia en el rearrreglo del citoesqueleto de actina es un parámetro empleado para definir a los receptores fagocíticos. Para determinar si la internalización de partículas mediada por CD13 es dependiente del rearrreglo del citoesqueleto de actina, evaluamos la fagocitosis mediada por CD13 en células THP-1 tratadas con 200nM de citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina, o con DMSO como control de vehículo. En la figura 9A, se muestra un *dot-plot* representativo de estos experimentos. El tratamiento de las células con citocalasina D resultó en una inhibición estadísticamente significativa de la internalización de partículas a través de CD13 (Fig. 9B, media 6.9%,

n=9), comparado con el tratamiento con el vehículo (Fig. 9B, media DMSO 33.0%, n=9). Como se esperaba, la fagocitosis mediada por el Fc γ RI también se inhibió por el tratamiento con citocalasina D (Fig. 9B, media DMSO 40.3% vs media citocalasina D 4%, n=9), lo cual es indicativo de que la inhibición del rearrreglo del citoesqueleto alcanzada con la citocalasina D en nuestros experimentos es suficiente para afectar la fagocitosis mediada por un receptor clásico. Estos datos demuestran que la internalización de partículas mediada por CD13 depende de la reorganización del citoesqueleto de actina, sugiriendo que la internalización de partículas grandes observado, es un fenómeno de fagocitosis.

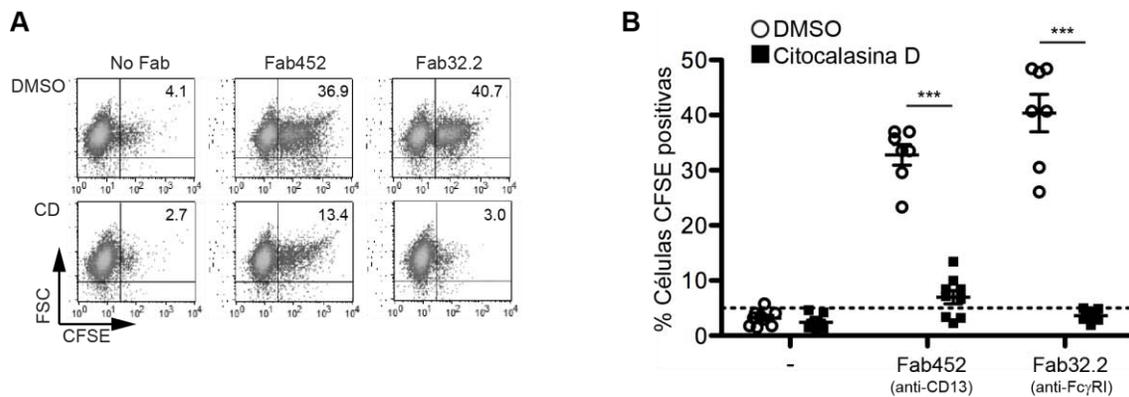


Figura 9. La fagocitosis mediada por CD13 es dependiente del rearrreglo del citoesqueleto de actina. Células THP-1 se pre-incubaron con 200 nM de citocalasina D por 2h a 37°C. Posteriormente las células se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 μ g de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Las células se lavaron e incubaron con los EBS-Fabs por 105 min a 37°C ó 4°C, siempre en presencia de citocalasina D. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CFSE positivas. (A) Gráfica de puntos representativa de un experimento. (B) Promedio de células CFSE positivas de 9 experimentos independientes. ***p<0.0001.

4.6 La activación de Syk está involucrada en la fagocitosis mediada por CD13

Los cambios en el citoesqueleto de actina durante la fagocitosis están regulados por vías de señalización río abajo de los receptores fagocíticos ligados. Las vías de señalización mejor descritas durante la fagocitosis son aquellas iniciadas por la ligación de los receptores opsónicos Fc γ Rs y CR3. La cinasa de tirosina Syk se activa por fosforilación como consecuencia del entrecruzamiento de los Fc γ Rs o CR3, por anticuerpos o por partículas que contienen a sus ligandos [1]. Como se mencionó en la introducción, no existe polémica acerca de que la activación de Syk es requerida para la

fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, sin embargo, el papel de Syk en la fagocitosis mediada por CR3 ha sido controversial, ya que la fagocitosis a través de CR3 es normal en macrófagos deficientes de Syk [54], pero es severamente disminuida como resultado de la transferencia de siRNA anti-Syk o por una forma dominante negativa de Syk en las células HL-60 [56]. En el caso de Dectina-1, el receptor no opsónico de β -glucanos, se ha mostrado que Syk es fosforilado durante la fagocitosis a través de este receptor en macrófagos [55], sin embargo la fagocitosis a través de Dectina-1 no es dependiente de la activación de Syk en macrófagos [28,55] pero si es dependiente de la activación de Syk en fibroblastos [28], lo que indica que la fagocitosis mediada por Dectina-1 podría involucrar a otras cinasas tempranas además de Syk. Estos datos sugieren que la activación de Syk no es indispensable para la fagocitosis a través de todos los tipos de receptores fagocíticos, incluso aunque estos receptores sean capaces de inducir su activación como consecuencia de la unión de su ligando. Para investigar si la fagocitosis a través de CD13 es dependiente de la activación de Syk, empleamos el inhibidor farmacológico de Syk, piceatannol. Pre-incubamos células THP-1 o hMDMs con piceatannol 50 μ M o con DMSO como control de vehículo, y medimos la fagocitosis de EBS-Fabs. El tratamiento de las células con piceatannol inhibió completamente la fagocitosis mediada por CD13 tanto en hMDMs (Fig. 10A, media DMSO 24.7% vs media piceatannol 6.0%, n=5) como en células THP-1 (Fig. 10B, media DMSO 25.3% vs media piceatannol 6.3%, n=8). El tratamiento de las células con Fab452 y piceatannol resultó en porcentajes de células CFSE-positivas similares a la fagocitosis basal (No Fab, línea punteada) tanto en hMDMs (Fig. 10A) como en THP-1 (Fig. 10B). La fagocitosis mediada por el Fc γ RI, como se esperaba, también se abolió con el tratamiento de las células con piceatannol tanto en hMDMs (Fig. 10A, media DMSO 31% vs media piceatannol 5.5%, n=5) como en THP-1 (Fig. 10B, media DMSO 26.7% vs media piceatannol 6.8%, n=8). Para profundizar en la caracterización del papel de Syk en la fagocitosis mediada por CD13, empleamos otro inhibidor de Syk, BAY 61-3606. Este segundo inhibidor farmacológico de Syk es más específico, se ha reportado que tiene 600 veces más selectividad por Syk respecto a otras cinasas; en contraste, aunque el piceatannol ha sido empleado extensivamente en la literatura como inhibidor de Syk,

presenta sólo alrededor de 10 veces más selectividad por Syk que por otras cinasas

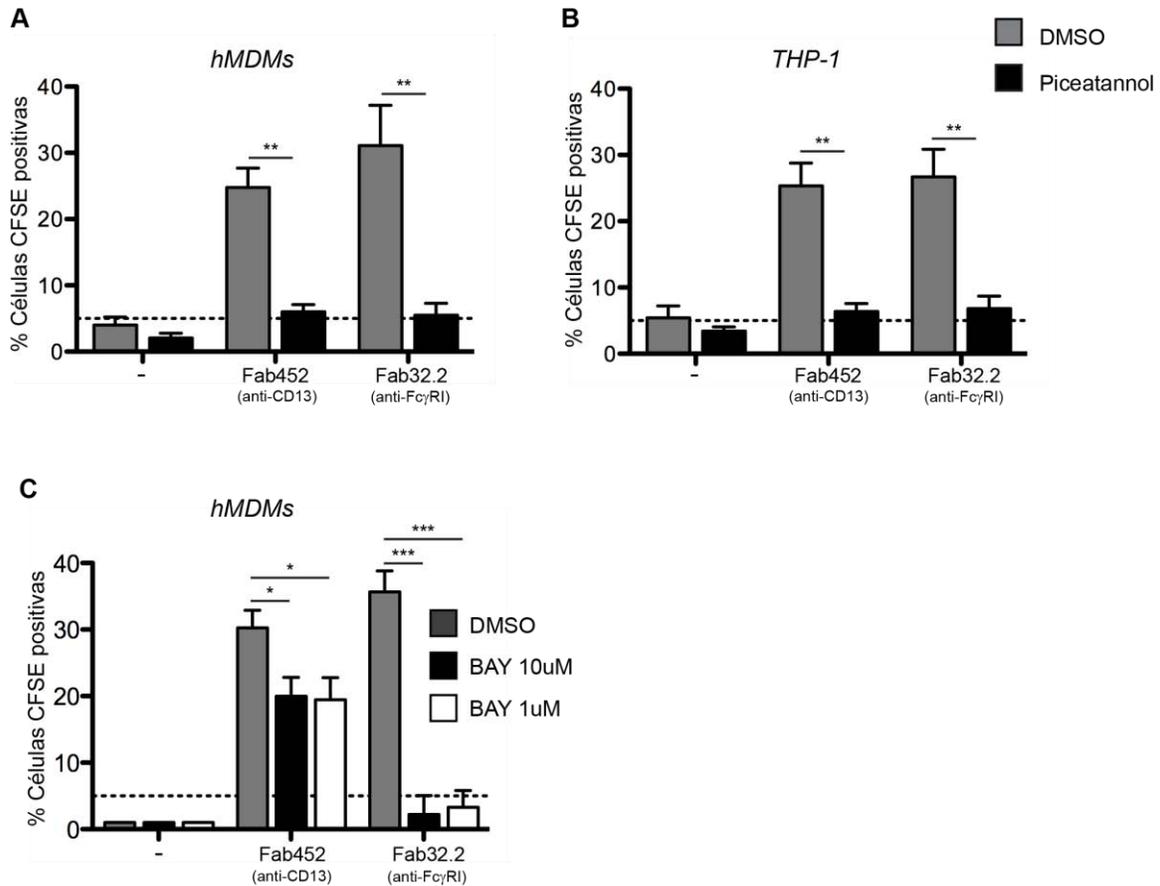


Figura 10. Syk está involucrada en la fagocitosis mediada por CD13. hMDMs o células THP-1 se pre-incubaron con 50 μ M de piceatannol o 1 o 10 μ M de BAY 61-3606 por 2h a 37°C. Posteriormente las células se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 μ g de de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Las células se lavaron e incubaron con los EBS-Fabs por 45 min (hMDMs) o 105 min (THP-1) a 37°C ó 4°C, siempre en presencia piceatannol o BAY 61-3606. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CFSE positivas. (A) Promedio de hMDMs CFSE positivos de 5 experimentos independientes en presencia de piceatannol. **p<0.005 (B) Promedio de células THP-1 CFSE positivas de 8 experimentos independientes en presencia de piceatannol ***p<0.005. (C) Promedio de hMDMs CFSE positivos de 7 experimentos independientes en presencia de BAY1 ***p<0.0005.

involucradas en fagocitosis, incluyendo a PI3K y Src. Pre-incubamos hMDMs en medio con 1 o 10 μ M de BAY o con DMSO como control de vehículo y medimos la fagocitosis de los EBS-Fabs. Como se muestra en la figura 10C, la fagocitosis a través de CD13 se redujo en un 35% en las células tratadas con BAY (media DMSO 30.2% vs BAY 10 μ M 19.9% vs BAY 1 μ M 19.4%, n=7). La inhibición parcial de la fagocitosis a través de CD13 no es consecuencia de una inhibición incompleta de Syk, ya que la fagocitosis a través del Fc γ RI –la cual es absolutamente dependiente de la activación de Syk– se inhibió completamente a las dos concentraciones de BAY empleadas (Fig. 10C, media

DMSO 35.6% vs BAY 10 μ M 2.2% vs BAY 1 μ M 3.3%, n=7). En células THP-1 también obtuvimos una tendencia similar, con una inhibición de alrededor del 50% de la fagocitosis, sin embargo no alcanzamos el tamaño de muestra suficiente para hacer un análisis estadístico (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la activación de Syk contribuye a, pero no es esencial para, la fagocitosis mediada por CD13. Estos resultados también sugieren que la fagocitosis mediada por CD13 probablemente involucre al menos dos diferentes vías de señalización temprana, una que es Syk-dependiente y otra que es Syk-independiente.

Dado que los datos anteriores sugieren que la fagocitosis a través de CD13 tiene un componente Syk-dependiente, determinamos si el entrecruzamiento de CD13 induce la fosforilación de Syk. Para estos experimentos, los hMDMs fueron estimulados por agregación de CD13 o de Fc γ RI por 45s a 37°C, y se analizó la fosforilación de Syk (pY348) por citometría de flujo. Se muestra un histograma (Fig. 11A) y una gráfica de contornos (Fig. 11B) representativos de estos experimentos. La fosforilación de Syk como consecuencia del entrecruzamiento de CD13 es estadísticamente distinta de las células no estimuladas (sólo Fabs secundarios) y también de las células estimuladas por el entrecruzamiento del Fc γ RI a los 45s (Fig. 11C, n=5). Inesperadamente, observamos que a los 45s, la agregación de CD13 induce la fosforilación de Syk, mientras que la agregación del Fc γ RI no lo hace, sugiriendo que la fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento de CD13 sigue una cinética diferente que la fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento de Fc γ RI. De hecho, en experimentos preliminares para determinar el tiempo óptimo para medir la activación de Syk después del entrecruzamiento de CD13, encontramos que la agregación de CD13 induce una fosforilación rápida, que alcanza el máximo alrededor de los 40s y comienza a disminuir rápidamente (Fig. 11D). En contraste, la fosforilación de Syk inducida por la agregación del Fc γ RI comienza a ser detectada hasta los 60s después de la agregación del receptor (Fig. 11D), y esta fosforilación se mantiene presumiblemente por varios minutos [84,146]. Como un control adicional se entrecruzó a los Fc γ RI y Fc γ RII con anticuerpos completos (32.2 y IV.3, respectivamente) y se encontró que la cinética de la fosforilación de Syk luego de la agregación del Fc γ RI empleando fragmentos Fab anti-Fc γ RI (Fab32.2)

es idéntica a la cinética de la fosforilación de Syk empleando el anticuerpo anti-FcγRI

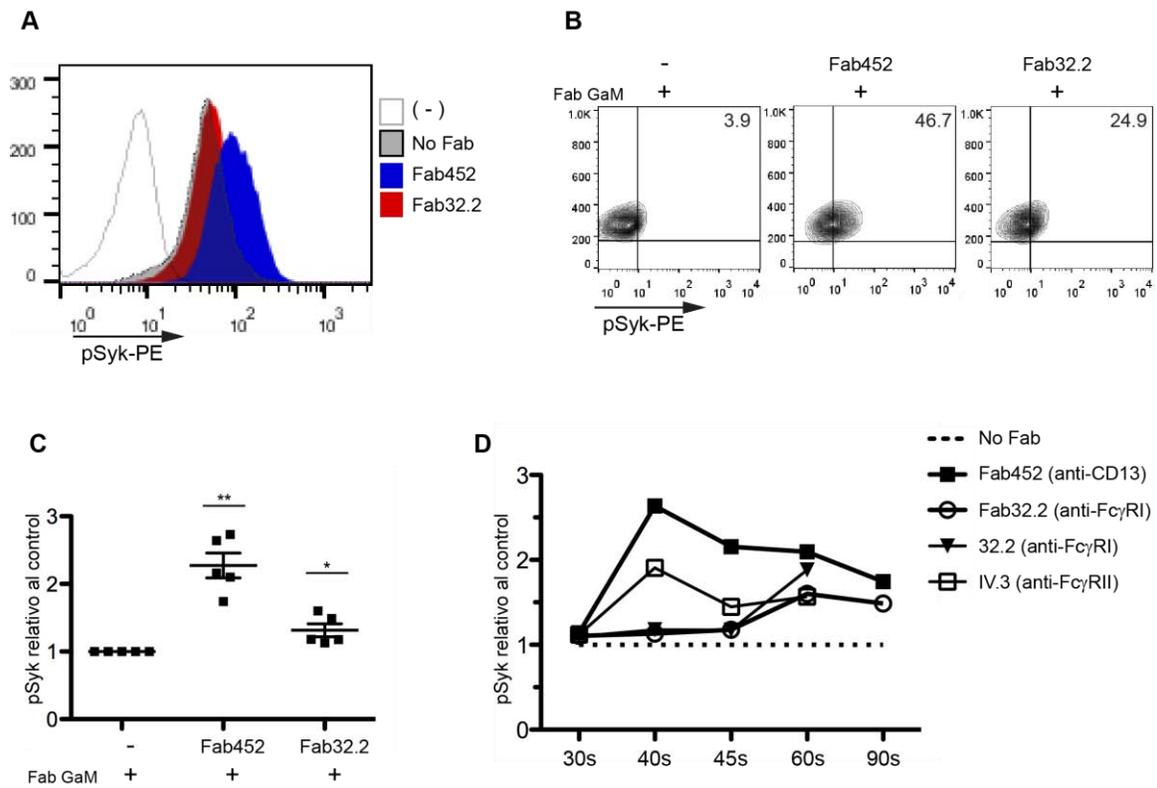


Figura 11. El entrecruzamiento de CD13 induce la fosforilación de Syk. hMDMs se incubaron con 4µg de fragmentos Fab del mAb452, 10µg de fragmentos Fab del mAb32.2, 10µg del anticuerpo 32.2, 10µg del anticuerpo IV.3 o sin anticuerpo primario (control) por 30 min a 4°C, las células se lavaron y se incubaron con 0.8 µg de fragmentos F(ab)'2 de IgG de cabra anti-ratón por 10 min a 4°C, seguido de una incubación a 37°C (entrecruzamiento) por 45s (A-C) o por el tiempo indicado (D). Las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo anti-pSyk conjugado con PE, y se analizaron por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de un experimento. (B) Gráfica de contornos representativo de un experimento. (C) Promedio de la intensidad media de fluorescencia de 5 experimentos independientes relativos al control. **p<0.005, *p<0.05 (D) Cinética de fosforilación de Syk con los diferentes anticuerpos.

completo (32.2) para entrecruzar. Además, nuestros resultados sugieren que la fosforilación de Syk como resultado del entrecruzamiento del FcγRII sigue una cinética diferente a la inducida por el entrecruzamiento del FcγRI y que es más parecida a la cinética de fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento de CD13 (Fig. 11D). En conjunto, estos resultados indican que la agregación de CD13 induce la fosforilación de Syk, y que la fagocitosis mediada por CD13 en macrófagos –y probablemente en THP-1 también- es parcialmente dependiente de la activación de Syk.

4.7 PI3K es requerida durante la fagocitosis mediada por CD13

Se ha reportado que la activación de las MAPKs y el aumento de Ca^{2+} intracelular inducidos por la agregación de CD13 son suprimidos con inhibidores de PI3K [113], lo que sugiere que la agregación de CD13 induce la activación de PI3K. Durante la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma$ Rs, la activación de PI3K yace río abajo de la activación de Syk, y su activación es esencial para la fagocitosis. Dado que observamos que la fagocitosis mediada por CD13 es parcialmente dependiente de Syk, y que el entrecruzamiento de CD13 induce la activación de Syk, investigamos si PI3K está involucrado en la fagocitosis mediada por CD13. Para estos experimentos, pre-incubamos células THP-1 o hMDMs con el inhibidor farmacológico de PI3K LY294002 (LY) y medimos fagocitosis. El tratamiento de las células con LY resultó en una fuerte inhibición de la fagocitosis mediada por CD13 tanto en macrófagos humanos derivados de monocitos (Fig. 12A, media DMSO 27.4% vs LY 7.1%, n=5) como en células THP-1 (Fig. 12B, media DMSO 25.3% vs LY 5.6%, n=9). Como se ha reportado extensivamente, la fagocitosis a través del $Fc\gamma$ RI se inhibió completamente con el tratamiento de LY294002, tanto en hMDMs (Fig. 12A, media DMSO 31.6% vs LY 6.6%) como en THP-1 (Fig. 12B, media DMSO 29.3% vs LY 2.7%, n=9) como. Estos datos sugieren que la activación de PI3K está involucrada en la fagocitosis mediada por CD13 en células THP-1 y en macrófagos.

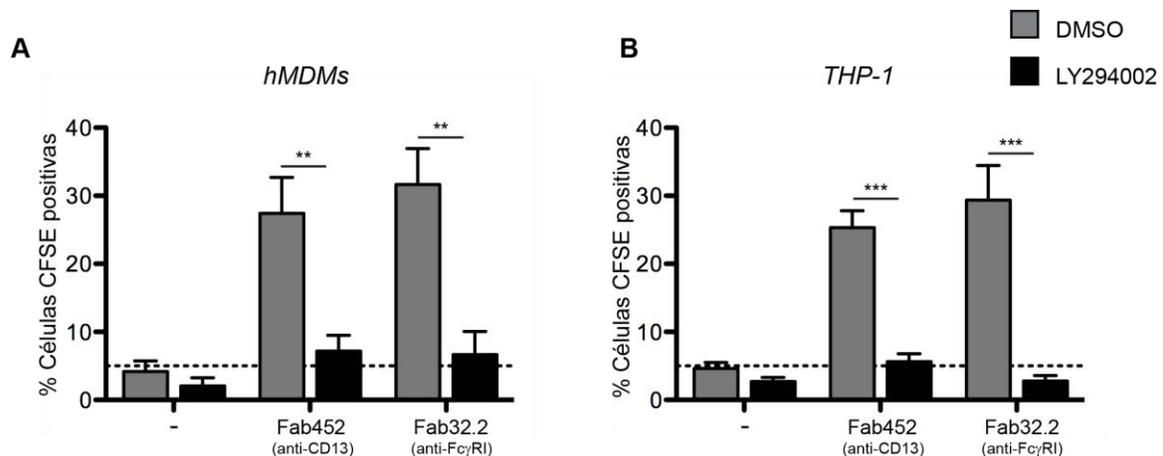


Figura 12. La activación de PI3K es requerida para la fagocitosis mediada por CD13. hMDMs o células THP-1 se pre-incubaron con 50 μ M de LY294002 por 2h a 37°C. Posteriormente las células se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 μ g de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C. Las células se lavaron e incubaron con los EBS-Fabs por 45 min (hMDMs) o 105 min (THP-1) a 37°C ó 4°C, siempre en presencia de LY. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CFSE positivas. (A) Promedio de

hMDMs CFSE positivos de 5 experimentos independientes de fagocitosis en presencia de piceatannol. (B) Promedio de células THP-1 CFSE positivas de 8 experimentos independientes de fagocitosis en presencia de piceatannol
 ***p<0.0005, **p<0.005

4.8 Diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD13 pueden mediar fagocitosis

Existen diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD13 bien caracterizados que poseen diferentes efectos sobre la actividad enzimática de CD13 y se unen a diferentes epítomos de la molécula. Dentro del panel de diferentes anticuerpos anti-CD13, el mAb WM-15 se une al sitio activo de CD13 y es el mejor anticuerpo inhibidor de la actividad enzimática reportado [105,147]. En contraste, el mAb 452 presenta un menor efecto, aunque significativo, sobre la actividad enzimática, y se ha demostrado que se une a un epítomo diferente al reconocido por el mAb WM-15 [105]. Un tercer monoclonal anti-CD13, mAb C fue desarrollado en nuestro laboratorio. Se caracterizó que el mAb C se une a un epítomo distinto a los epítomos reconocidos por los mAbs 452 y WM-15, pero en un sitio cercano al epítomo reconocido por el WM-15 (Fig. 13). El efecto del mAb C en la actividad enzimática de CD13 no se había determinado previamente.

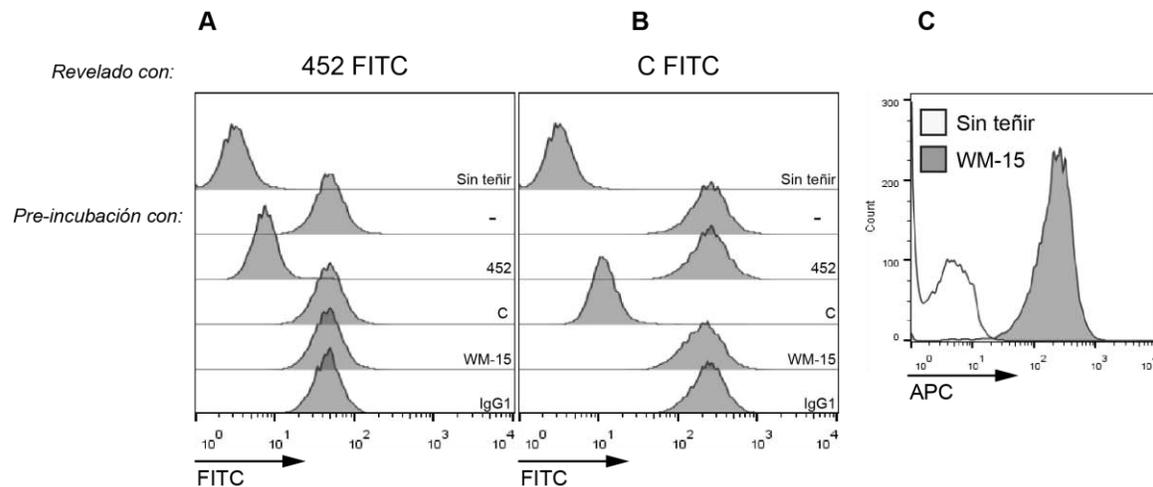


Figura 13. Los mAbs 452, C y WM-15 se unen a diferentes epítomos de CD13. Células U-937 se pre-incubaron con los mAbs 452, WM-15, C, IgG1 o sin anticuerpo (-) por 30 min a 4°C. Las células se lavaron y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-CD13 acoplado a FITC por 30 min a 4°C, para revelar si la unión del segundo anticuerpo se bloquea por la unión del primer anticuerpo. Las células se lavaron, fijaron y analizaron por citometría de flujo. (A) La unión del mAb 452-FITC no se bloquea con la pre-incubación con los mAbs C o WM-15. (B) La unión del mAb C-FITC no se bloquea con la pre-incubación con los mAbs 452 o WM-15. (C) Se muestra la unión del mAb WM-15 a las células U-937.

Empleamos estos tres diferentes anticuerpos anti-CD13 y medimos su capacidad para mediar fagocitosis en hMDMs. Encontramos que los tres anticuerpos anti-CD13 son

capaces de inducir fagocitosis en un grado similar (Fig. 14A, media Fab452 32.0%, media Fab C 29.8%, media WM-15 26.04%, n=7). Aunque la fagocitosis mediada por CD13 en las células tratadas con WM-15 es menor, esta diferencia no es estadísticamente significativa comparada con la fagocitosis en las células tratadas con Fab452 o Fab C. Cabe mencionar que los tres anticuerpos anti-CD13 mostraron niveles similares de unión a las células en estos experimentos (Fig. 14B). Estos resultados sugieren que el epítipo reconocido por el anticuerpo anti-CD13 empleado para agregar CD13 en la membrana, no es importante para que la fagocitosis mediada por CD13 ocurra. El mismo fenómeno se ha descrito para la adhesión mediada por CD13, donde el entrecruzamiento de CD13 por distintos anticuerpos anti-CD13 (mAbs 452, WM-15, Y2-K o WM-4.7) resultan en adhesión mediada por CD13, sin embargo, ninguno de estos anticuerpos es capaz de inducir adhesión cuando se emplean solo fragmentos Fabs sin anticuerpo secundario [105]. Estos datos sugieren que el entrecruzamiento de CD13, y no el epítipo reconocido por el anticuerpo particular empleado para agregar CD13, es el factor determinante durante la adhesión y fagocitosis mediada por CD13.

También determinamos el efecto de estos tres diferentes anticuerpos anti-CD13 sobre la actividad enzimática en hMDMs, a las concentraciones empleadas en los ensayos de fagocitosis. Como control para las determinaciones de actividad enzimática, empleamos bestatina, un inhibidor químico de aminopeptidasas bien caracterizado. Como se muestra en la figura 14C, el tratamiento de los hMDMs con bestatina inhibió la actividad enzimática de CD13 de manera dosis dependiente. De acuerdo con reportes previos, el tratamiento de las células con Fab452 resultó en una pequeña (20%), pero estadísticamente significativa inhibición de la actividad enzimática (media Fab452 79.3%, n=6), y el tratamiento de los hMDMs con WM-15 redujo la actividad enzimática de CD13 en un 40% (media WM-15 59.9%, n=6) [104,148]. El tratamiento de los MDMs con Fab C, inhibió significativamente la actividad enzimática de CD13 (30% inhibición) (media Fab C 67.1%, n=6). Como se esperaba, el tratamiento de los MDMs con Fab32.2 o con IgG1 no tuvo efecto sobre la actividad enzimática con respecto a las células control (media Fab32.2 94.6%, media IgG1 97.0%, n=6). Este experimento muestra que los distintos anticuerpos anti-CD13 inhiben la actividad enzimática a diferente grado, y que

como se ha sugerido previamente estas diferencias podrían estar relacionadas a su unión a diferentes epítomos.

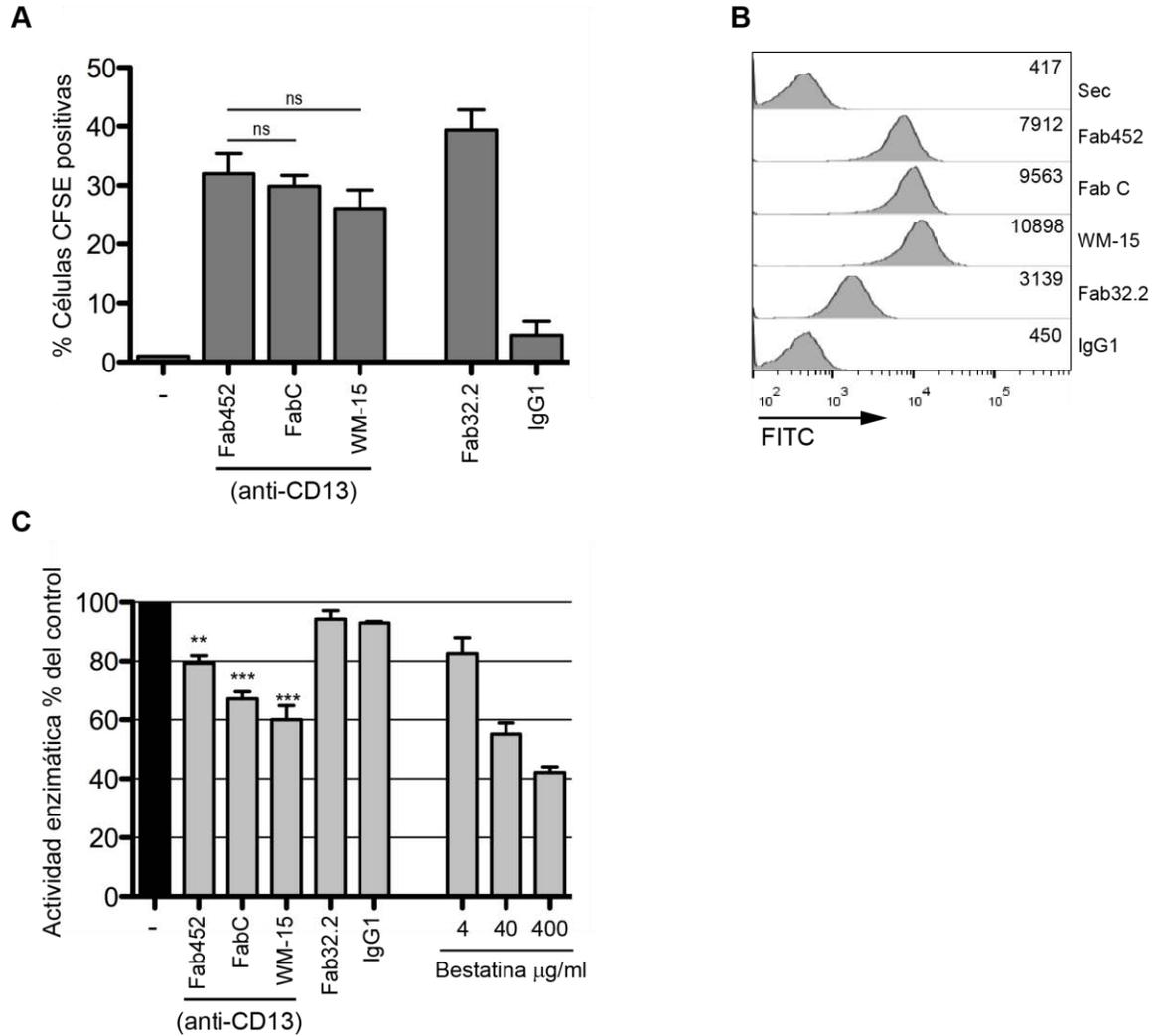


Figura 14. Diferentes anticuerpos anti-CD13 pueden mediar fagocitosis. hMDMs se incubaron con 2 µg de fragmentos Fab del mAb452, 2 µg de fragmentos Fab del mAbC, 2 µg de fragmentos Fab del mAbC WM-15, 8 µg de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI), 8 µg de IgG1 o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C, se lavaron y se incubaron con los EBS-Fabs por 105 min a 37°C ó 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CFSE positivas. (A) Promedio de células CFSE positivas de 7 experimentos independientes de fagocitosis en presencia de piceatannol. (B) Histograma representativo de la unión de los diferentes anticuerpos a hMDMs. Para los ensayos de determinación enzimática los hMDMs se incubaron con 2 µg de fragmentos Fab del mAb452, 2 µg de fragmentos Fab del mAbC, 2 µg de fragmentos Fab del mAbC WM-15, 8 µg de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI), 8 µg de IgG1, sin anticuerpo (No Fab) o con Bestatina a 4, 40 o 400 µg/ml por 30 min a 4°C. Las células se lavaron y se incubaron por 105 min a 37°C, el sustrato se añadió durante los últimos 45 min de incubación a 37°C, la absorbancia a 405 nm se determinó inmediatamente. (C) Promedio de la absorbancia de 6 experimentos independientes con respecto al control ***p<0.0005, **p<0.005.

4.9 La fagocitosis mediada por CD13 es independiente de su actividad enzimática

Algunas de las funciones atribuidas a CD13 dependen de su actividad de aminopeptidasa. Sin embargo, como se ha mencionado, otras funciones son independientes de su actividad enzimática. Dado que los tres diferentes anticuerpos anti-CD13 muestran diferentes efectos en la actividad enzimática (Fig. 14C), pero no encontramos diferencias en la fagocitosis inducida por los tres diferentes anticuerpos (Fig. 14A), nuestros datos sugieren que la fagocitosis mediada por CD13 es independiente de su actividad enzimática.

Para establecer si la actividad enzimática de CD13 es requerida durante la fagocitosis mediada por CD13, bloqueamos la actividad enzimática de CD13 con bestatina y medimos fagocitosis en células THP-1 tratadas con Fab452. El tratamiento con bestatina inhibió la actividad enzimática de CD13 en un 40% (Fig. 15A). En contraste, la fagocitosis a través de CD13 en las células tratadas con bestatina no se alteró, comparada con las células no tratadas (Fig. 15B, media DMSO 27.0% vs media bestatina 27.4%, n=4). Estos indican que la fagocitosis mediada por CD13 es independiente de su actividad enzimática.

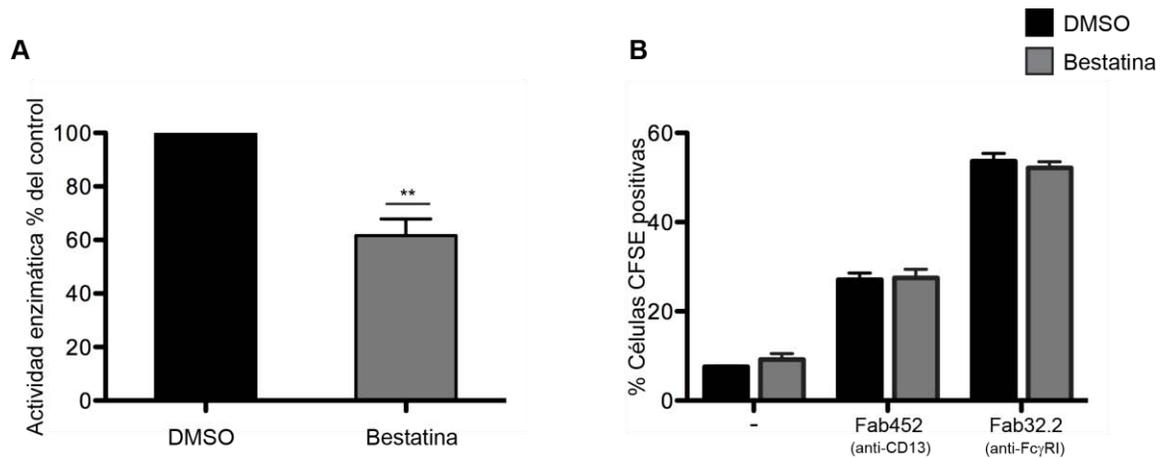


Figura 15. La fagocitosis mediada por CD13 es independiente de su actividad enzimática. (A) Células THP-1 se incubaron con 4 μ g/ml de bestatina o DMSO por 40 min a 37°C. Posteriormente las células se incubaron por 30 min a 4°C. Después de lavarlas, las células se incubaron por 105 min a 37°C, siempre en presencia de bestatina, el sustrato se añadió en los últimos 45 minutos de esta incubación y la densidad a 450 nm se determinó inmediatamente. Se muestra el promedio de la absorbancia de 4 experimentos independientes relativo al control **p 0.008. (B) Células THP-1 se incubaron con 4 μ g/ml de bestatina o DMSO por 40 min a 37°C. Luego las células fueron incubadas con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), 8 μ g de fragmentos Fab del mA32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C, se lavaron y se incubaron con los EBS-Fabs por 105 min a 37°C ó 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar

el porcentaje de células CFSE positiva. Promedio de células CFSE positivas de 4 experimentos independientes de fagocitosis en presencia de bestatina.

4.10 La expresión de CD13 en células epiteliales es suficiente para inducir fagocitosis mediada por CD13

La estrategia más poderosa empleada en la literatura para demostrar la capacidad de un receptor de membrana para mediar fagocitosis, consiste en expresar la proteína de interés en un contexto celular diferente, usualmente en una célula no fagocítica, y mostrar que esto confiere capacidad fagocítica a la célula. Para confirmar el papel de CD13 como un receptor fagocítico primario, expresamos CD13 en la línea celular epitelial HEK293. Estas células no expresan la mayoría de los receptores fagocíticos conocidos ni CD13. Utilizando otra vez un sistema lentiviral de transformación, se infectaron células HEK293 con un vector para la expresión de hCD13 (CD13 humano) y RFP bajo promotores distintos. Como control, eliminamos la secuencia de hCD13 del vector, dejando solamente la construcción de expresión de RFP. Después de la selección y clonación, obtuvimos clones con expresión alta (clona A6) y media (clona A4) de hCD13 (Fig. 16A). Como se muestra en la figura 16A, las células infectadas con el virus que contenía solamente la secuencia de expresión de RFP (clona M6) no expresan CD13. Dado que las células HEK293 crecen como monocapa adheridas a la superficie, y notamos que los lavados repetidos necesarios para los ensayos de fagocitosis rompían las monocapas y afectaban la viabilidad celular y la cantidad de células, modificamos la construcción de las partículas fagocitables para que éstas llevaran el Fab específico Fab anti-CD13 (EFab452) o el Fab anti-Fc γ RI (EFab32.2) (Fig. 17A). Empleando esta construcción modificada de la partícula fagocitable, la monocapa no requiere lavados previos a la incubación con la partículas fagocitables (Fig. 17B).

Primero verificamos que las partículas modificadas indujeran fagocitosis en células THP-1 por citometría de flujo (Fig. 16B) y microscopía confocal (no mostrado). Como se muestra en la figura 16B, las células THP-1 internalizan de manera muy eficiente las partículas fagocitables a través de CD13 (EFab452) y a través de Fc γ RI (EFab32.2), pero no internalizan las partículas que no están cubiertas con los fragmentos Fab de IgG murinas anti-humano (Ec).

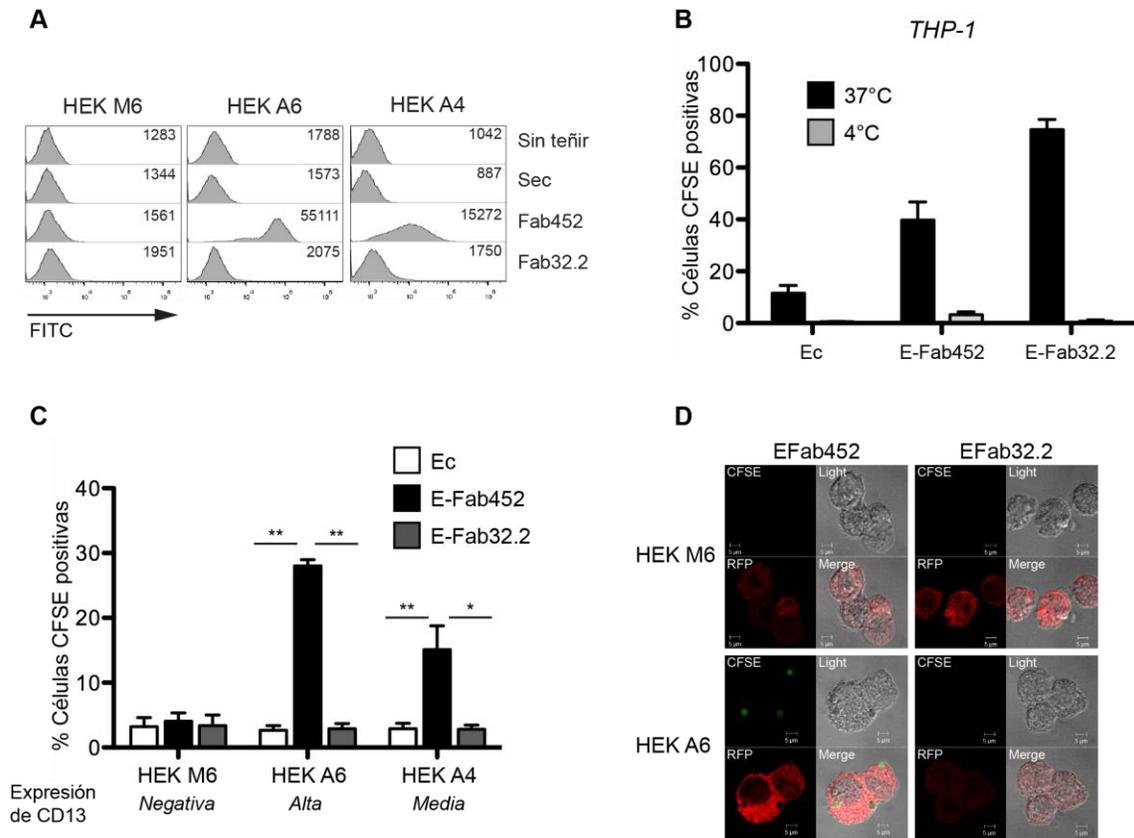


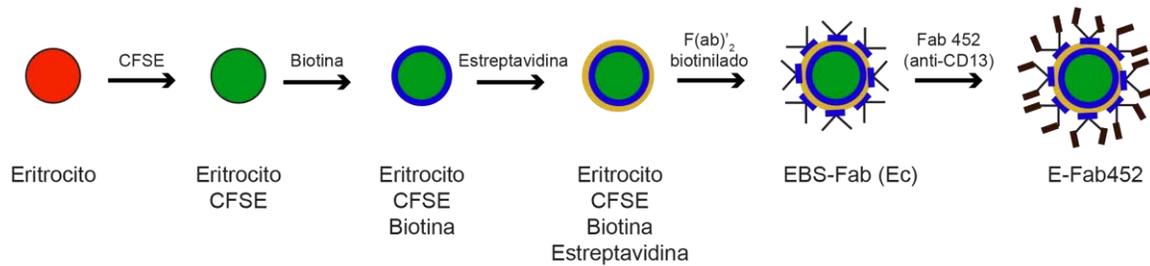
Figura 16. La expresión de hCD13 en células epiteliales es suficiente para inducir fagocitosis. (A) Células HEK293 transducidas con las partículas lentivirales que contenían los plásmidos de expresión de CD13 pLenti-suCMV(ANPEP)-Rsv(RFP-Bsd) (clonas A4 y A6) y el plásmido control de la transfección pLenti-suCMV(empty)-Rsv(RFP-Bsd) (clona M6) se incubaron con 2 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 μ g de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-Fc γ RI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C, las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Se muestra un histograma representativo de la expresión de hCD13 en estas clonas. (B) Células THP-1 o (C) las clonas HEK293 A4, A6 y M6, se incubaron con EFab452, EFab32.2 o Ec por 120 min a 37°C. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. (C) Se muestra el promedio de células positivas para CFSE de 5 experimentos independientes ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ (D) Imagen representativa de la fagocitosis en las clonas HEK293 A6 y M6 (rojas por la expresión de RFP) incubadas con los EFab452 y EFab32.2 (verde).

Las clonas con expresión alta (HEK293 A6) y media (HEK293 A4) de CD13 son capaces de internalizar partículas opsonizadas con Fab452 (EFab452) pero no partículas opsonizadas con Fab32.2 (EFab32.2) (Fig. 16C, $n=5$). Las clonas que no expresan CD13 (HEK293 M6) no internalizan ninguna partícula fagocitable. Es interesante hacer notar que el grado de internalización de la partícula correlaciona con el nivel de expresión de hCD13, ya que las HEK293 CD13^{high} (A6) son más competentes para internalizar eritrocitos (Fig. 16C, media 28%, $n=5$) que las HEK293 CD13^{med} (A4) (Fig. 16C, media 15%, $n=5$). Los resultados de citometría fueron confirmados por microscopía confocal (Fig. 16D), se observó internalización de eritrocitos en las células A6 solamente cuando

los eritrocitos se opsonizaron con Fabs-anti-CD13 (Fig. 16D, EFab452, panel inferior izquierdo), pero no se observó internalización cuando los eritrocitos se opsonizaron con Fab-anti-Fc γ RI (Fig. 16D, EFab32.2, panel inferior derecho). Los paneles superiores de la figura 16D muestran las mismas condiciones para la clona M6.

Este experimento nos permitió descartar la contribución de los Fc γ Rs y de otros receptores fagocíticos importantes, en la fagocitosis mediada por CD13, ya que las células HEK293 no expresan Fc γ Rs, CR3, ni la mayoría de los receptores scavenger. Estos resultados respaldan el papel de CD13 como un receptor capaz de inducir internalización independientemente de otros receptores fagocíticos. En conjunto, estos resultados proveen evidencia robusta de que la agregación de CD13 por interacción con partículas media fagocitosis, y que la fagocitosis de CD13 es independiente de otros receptores fagocíticos.

A) Construcción de las partículas fagocitables modificadas



B) Ensayo de Fagocitosis Selectiva Modificada

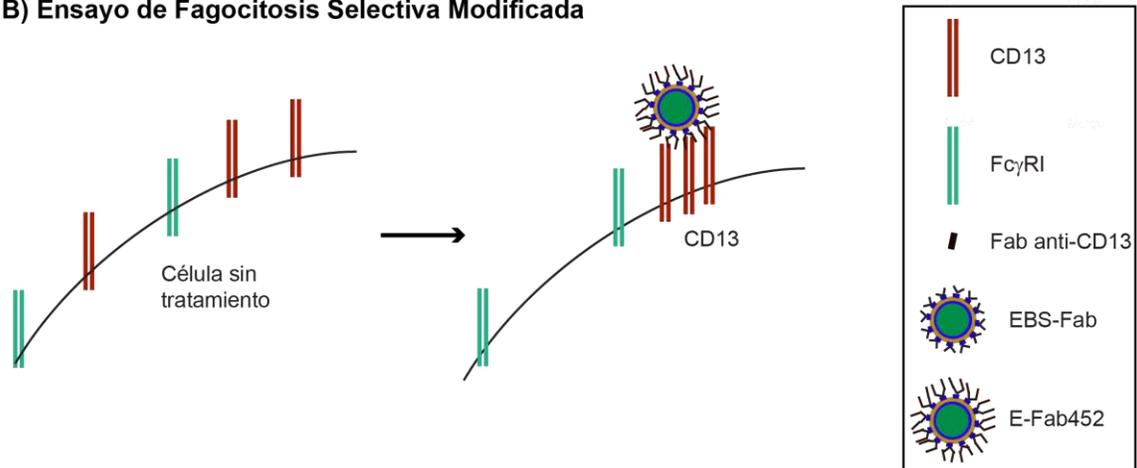


Figura 17. Representación esquemática de los ensayos de fagocitosis selectiva modificada. (A) Construcción de EBS-Fab específico: los eritrocitos de carnero fueron marcados con CFSE, posteriormente se cubrieron progresivamente con biotina, estreptavidina, fragmentos F(ab)₂ de IgG de cabra-anti-IgG de ratón biotinilados y finalmente incubados con los fragmentos Fab del mAb murino 452 anti-CD13 (Fab452) o del mAb murino 32.2 (anti-Fc γ RI) o se dejaron sin tratamiento (Ec). (B) Las células no recibieron ningún tratamiento anterior a su incubación con las partículas fagocitables, se mezclaron con los EFab452, EFab32.2 o Ec. Los eritrocitos que no fueron internalizados

se lisaron por choque hipotónico. Y se analizó el porcentaje de células CFSE positivas por citometría o microscopía confocal.

4.11 La ligación de hCD13 expresado en macrófagos murinos induce la internalización de partículas y generación de ROS

Los fagocitos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en conjunto con la fagocitosis o como resultado de la estimulación con varios agentes. La generación de ROS se ha implicado en una variedad de respuestas fisiológicas y es un componente crítico del repertorio antimicrobiano de los macrófagos. Por tanto, se investigó si la agregación de CD13 resulta en la producción de ROS. Para estos experimentos, generamos células murinas con expresión de CD13 humano. Transformamos la línea murina tipo-macrófago J774 empleando el sistema descrito anteriormente para las células HEK293. Dado que las células J774 expresan CD13 y FcγRs murinos, primero verificamos que los Fabs utilizados en los ensayos de fagocitosis no se unieran a las células murinas. Como se muestra en la figura 18A, ni el Fab452 ni el Fab32.2 reconocen moléculas expresadas en las células murinas (células control M3). Después de la infección lentiviral, obtuvimos una línea estable de alta expresión de hCD13 (R3), y una línea control sin expresión de hCD13 (M3) (Fig. 18A). En estas células, medimos la internalización de las partículas opsonizadas con Fab-anti-CD13 (EFab452), con Fab-anti-FcγRI (EFab32.2) o sin Fab murino (Ec). Mientras que un alto porcentaje de células de la clona R3 fagocitaron EFab452 (Fig. 18B, media 26.5%, n=7), estas células no fagocitaron EFab32.2 ni Ec (Fig. 18B, n=7). Las células de la clona M3 no fagocitaron ninguna de las partículas fagocitables ensayadas (Fig. 18B, n=7). Los resultados de citometría fueron confirmados por microscopía confocal (Fig. 18C), se observó internalización de eritrocitos en las células R3 solamente cuando los eritrocitos se opsonizaron con Fabs-anti-CD13 (Fig. 18C, EFab452, panel inferior izquierdo), pero no se observó internalización cuando los eritrocitos se opsonizaron con Fab-anti-FcγRI (Fig. 18C, EFab32.2, panel inferior derecho). Los paneles superiores de la figura 18C muestran las mismas condiciones para la clona M3. La clona R3 internaliza eritrocitos muy eficientemente (Fig. 18B) comparada con la internalización por las HEK293 A6 (Fig.

16C), lo cual puede ser explicado por el hecho de que las células J774 son fagocitos profesionales, mientras que las células HEK293 no lo son.

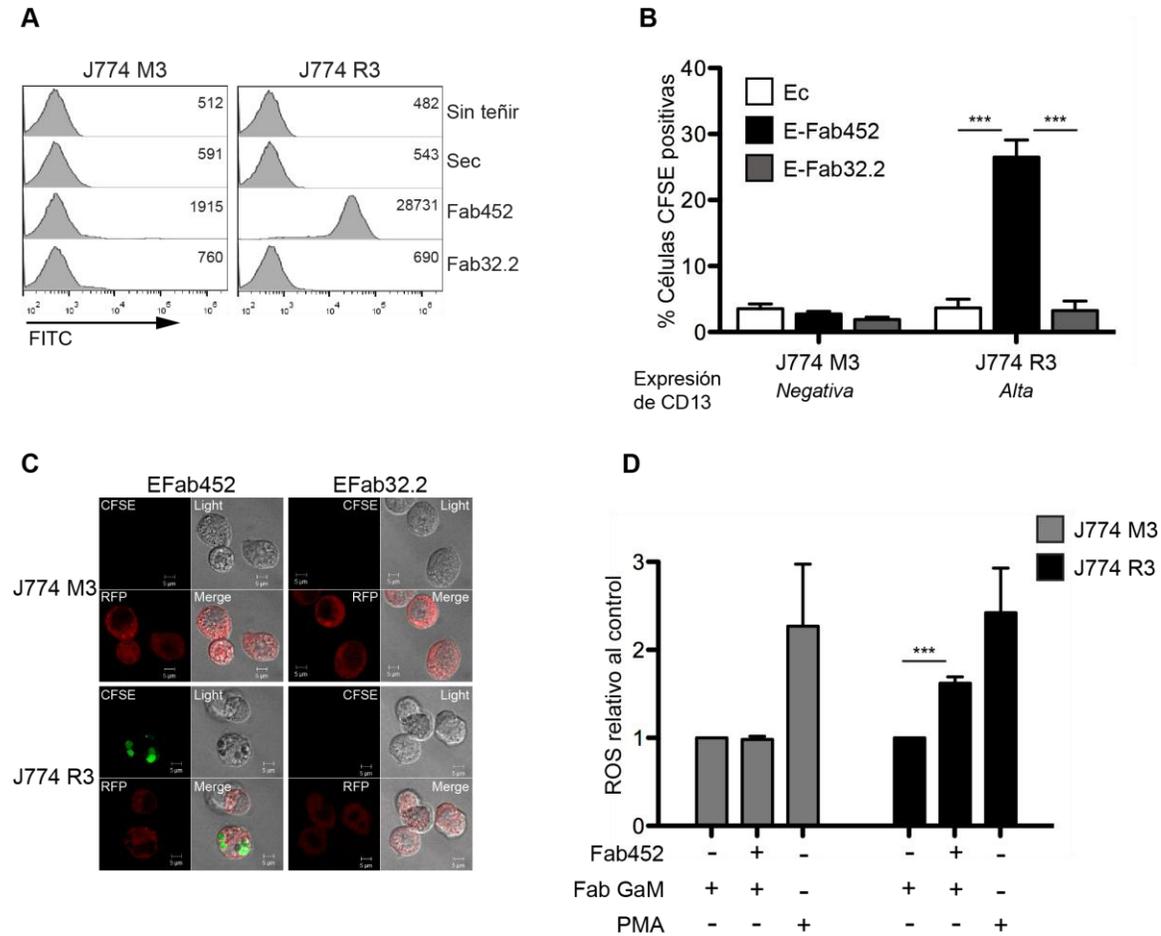


Figura 18. La ligación de hCD13 en macrófagos murinos induce la internalización de partículas y producción de ROS. (A) Células J774 transducidas con las partículas lentivirales con los plásmidos de expresión de CD13 pLenti-suCMV(ANPEP)-Rsv(RFP-Bsd) (clona R3) y el plásmido control de la transfección pLenti-suCMV(empty)-Rsv(RFP-Bsd) (clona M3) se incubaron con 2 µg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con 8 µg de de fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI) o sin anticuerpo (No Fab) por 30 min a 4°C, las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Se muestra un histograma representativo de la expresión de hCD13 en estas clonas. (B) Las clonas J774 R3 y M3, se incubaron con EFab452, EFab32.2 o Ec por 120 min a 37°C. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras se analizaron por citometría de flujo. Se muestra el promedio de células positivas para CFSE de 7 experimentos independientes ***p<0.0001 (C) Imagen representativa de la fagocitosis en las clonas J774 R3 y M3 (rojas por la expresión de RFP) incubadas con los EFab452 y EFab32.2 (verde). (D) Las clonas R3 y M3 se cargaron con CM-H₂DCFDA por 20 min a 37°C. Las células fueron tratadas con Fab452 para entrecruzar CD13 o con PMA como control. Se muestra el promedio de la intensidad media de fluorescencia de 5 experimentos independientes relativos al control, ***=0.0009

Habiendo demostrado que en los macrófagos murinos J774, el CD13 humano funciona como un receptor fagocítico, investigamos si la ligación de CD13 es capaz de inducir ROS. Empleando ligandos solubles para inducir la agregación de hCD13 en las células R3 (hCD13 positivas), medimos la generación de ROS empleando CM-

H₂DCFDA como indicador. Encontramos que el tratamiento con el Fab-anti-CD13 con un F(ab)₂ secundario induce ROS en las células R3 pero no en las células M3 (Fig. 18D, n=5), aunque tanto las células R3 como M3 producen ROS tras el tratamiento con PMA, lo cual indica que las células M3 son capaces de inducir ROS. Estos resultados sugieren que la fagocitosis a través de CD13 lleva a la generación de ROS, lo cual potencialmente podría promover la degradación del material internalizado a través de CD13.

4.12 Regulación mediada por CD13 de la actividad de otros receptores

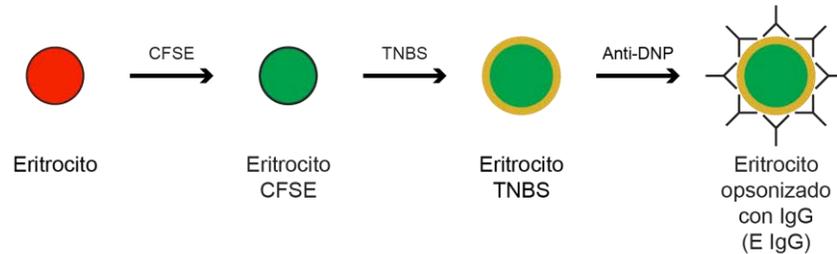
4.12.1. La fagocitosis mediada por los FcγRs es regulada positivamente por el entrecruzamiento de CD13

En trabajo previo del laboratorio [84], se reportó que la interacción simultánea del FcγRI y CD13 con partículas fagocitables resulta en una fagocitosis mayor (220%) que la fagocitosis resultante de la interacción de las partículas con FcγRI solamente, y que el entrecruzamiento simultáneo del FcγRI y CD13 resulta en una prolongación y aumento en el nivel de fosforilación de Syk, comparado con la fosforilación de Syk inducida por la agregación del FcγRI solamente. Estos resultados sugirieron que CD13 podría ser un regulador de la señal de la fagocitosis a través de los FcγRs. Sin embargo, habiendo demostrado que CD13 es un receptor fagocítico cabal, el aumento de la fagocitosis observado anteriormente podría ser resultado simplemente de la adición de la fagocitosis mediada por los dos receptores (FcγRI y CD13). Cuando se entrecruza el FcγRI se observa una fosforilación de Syk que puede ser detectada a partir de los 3 minutos y que comienza a disminuir a los 10 min, mientras que al entrecruzar CD13 se observa una fosforilación de Syk muy temprana que comienza a los 40s y que deja de ser detectada a los 3 min. En contraste, al co-agregar CD13 y FcγRI, la fosforilación de Syk se mantiene por más de 20 minutos [84]; estos datos sugieren la existencia una regulación de la actividad de Syk cuando los dos receptores se activan, ya que los datos no pueden ser explicados como una sumatoria de la fosforilación independiente de cada uno de los dos receptores.

Para investigar si efectivamente CD13 puede modular la fagocitosis a través de los FcγRs independientemente de su interacción con la partícula, construimos partículas

fagocitables opsonizadas con IgG (eritrocitos opsonizados con IgG, E IgG), las cuales interactúan solamente con los Fc γ Rs y no con CD13 (Fig. 19A), y medimos la fagocitosis en células en las que entrecruzamos CD13 empleando anticuerpos (Fig. 19B). De esta manera, CD13 no interactúa con la partícula fagocitable pero sí se entrecruza concomitantemente al entrecruzamiento de los Fc γ Rs (Fig. 19B).

A) Construcción de eritrocitos opsonizados con IgG



B) Ensayo de Fagocitosis a través de los Fc γ Rs

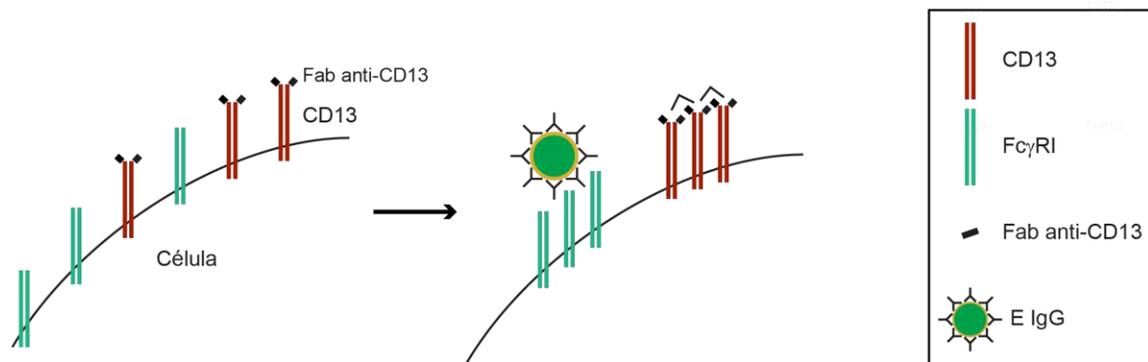


Figura 19. Representación esquemática de los ensayos de fagocitosis a través de los Fc γ Rs con entrecruzamiento simultáneo de CD13 por anticuerpos. (A) Construcción de E-IgG: los eritrocitos de carnero fueron marcados con CFSE, posteriormente se cubrieron progresivamente TNBS, y anticuerpos anti-DNP: E IgG (B) Las células fueron incubadas con fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13) por 30 min en hielo, posteriormente se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab) $'_2$ de IgG de cabra anti-IgG. Las células se pusieron en contacto con los E IgG o E (sin anticuerpos anti-DNP) y se incubaron por 2h 30 min a 37°C. Los eritrocitos que no fueron internalizados se lisaron por choque hipotónico. Y se analizó el porcentaje de células CFSE positivas por citometría de flujo.

Para estos experimentos, células THP-1 se incubaron con 0.01, 0.1, 1 ó 10 μ g de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13) o sin anticuerpo primario a 4°C; posteriormente las células se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab) $'_2$ de IgG de cabra anti-ratón (para entrecruzar CD13) por 30 min a 4°C y se lavaron. Finalmente, las células se incubaron con eritrocitos sin opsonizar (E) o con eritrocitos opsonizados con IgG (E IgG), por 2h 30 min, a 37°C o 4°C. La fagocitosis a través de los Fc γ Rs es modulada positivamente por el entrecruzamiento de CD13 de manera dosis dependiente (Fig. 20A,

n=7). Se observa que la saturación de la unión del Fab 452 no es necesaria para la regulación positiva de la fagocitosis, ya que como se muestra en la Fig. 20B, a dosis no saturantes (0.01 y 0.1 μg) de Fab 452, existe una modulación positiva eficiente de la fagocitosis a través de los Fc γ Rs. Estos experimentos comprueban que la agregación de CD13 en la membrana puede regular positivamente la fagocitosis a través de los Fc γ Rs, posiblemente al iniciar y reforzar vías de señalización compartidas, como se sugirió previamente [84].

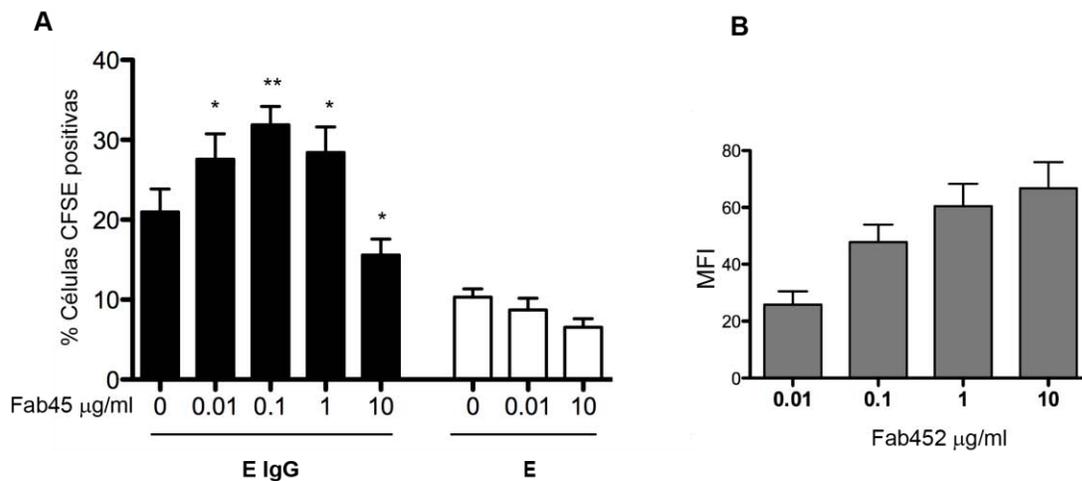


Figura 20. CD13 modula positivamente la fagocitosis a través de los Fc γ Rs. (A) Células THP-1 se incubaron con 0, 0.01, 0.1, 1 o 10 μg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), por 30 min a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas con los E IgG o con los E por 2h 45 min a 37°C ó 4°C. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Se muestra el promedio de células CFSE positivas de 7 experimentos independientes (B) Unión de 0.01, 0.1, 1 o 10 μg de fragmentos Fab del mAb452 a los hMDMs revelado con anticuerpo secundario acoplado a FITC. Se muestra el promedio de la MFI de 6 experimentos independientes.

4.12.2 El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3

El receptor de complemento 3 (CR3, Mac1, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$) es un receptor heterodimérico expresado en monocitos, macrófagos y neutrófilos, que está involucrado en adhesión, diapedesis y fagocitosis. El CR3 está compuesto de una cadena α específica (CD11b) y de la cadena β_2 (CD18) común a otros miembros de la familia de las integrinas β_2 . A diferencia de la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, que se inicia por la agregación de estos receptores en la membrana, la fagocitosis mediada por CR3 es regulada por el estado de activación del receptor. En células en reposo, CR3 es capaz de unir con baja afinidad a sus ligandos, pero no de internalizar partículas fagocitables

cubiertas con su ligando C3bi. Para que ocurra una internalización eficiente, se requiere de una señal previa de activación de la integrina. La activación de la integrina se induce ya sea por un cambio conformacional en el receptor, que resulta en una mayor afinidad por sus ligandos, o por la movilización lateral del receptor que resulta en agregación del receptor, lo cual aumenta su avidéz por el ligando. Tal activación se induce por la ligación de un receptor agonista, que inicia una vía de señalización intracelular que finalmente transmite la señal a la cola citoplásmica de la integrina. Esta señal, una señal originada de adentro-hacia-afuera (*inside-out*), se transmite a través de la membrana para iniciar los cambios conformacionales o los eventos de agregación que se asocian con la activación extracelular de la integrina. La activación *inside-out* de CR3, depende de moléculas de señalización como PKC, PI3K, MAPKs y Rap1, y se induce por diversos estímulos como citocinas, quimiocinas, PMA, algunos productos bacterianos como LPS, y por la activación de diversos receptores como CD44, TLR2 y los FcγRs.

Algunos de estos estímulos activan a CR3 a través del cambio conformacional de la integrina como TLR2 [149,150], otros inducen la movilización lateral de la integrina como los FcγRs [79], mientras que otros estímulos inducen ambos, como las quimiocinas [151] y CD44 [38].

Hemos mostrado en este trabajo y en trabajos anteriores [84,111], que la agregación de CD13 en la membrana regula positivamente la fagocitosis a través de los FcγRs y de otros receptores innatos, posiblemente a través de la inducción de vías de señalización comunes a entre receptores. Por lo tanto nos preguntamos si el entrecruzamiento de CD13 podría resultar en la activación *inside-out* de CR3. En estos experimentos, empleamos el anticuerpo CBRM1/5, que reconoce el epítipo expuesto en la cadena CD11b de la integrina, luego del cambio conformacional de activación. Para estos experimentos, se estimularon hMDMs por agregación de CD13 o de FcγRI o de FcγRII por 10 min a 37°C, y el estado de activación de CR3 se cuantificó por citometría de flujo empleando el anticuerpo CBRM1/5 conjugado a APC. Se muestra un histograma representativo de estos experimentos (Fig. 21A). Este análisis reveló que el entrecruzamiento de CD13, aumentó significativamente el estado de activación de CR3, comparado con las células sin tratamiento, o con las células en las que se entrecruzó FcγRI (Fig. 21B, n=7) o FcγRII (Fig. 21C) y II, ya sea usando fragmentos Fab de los

anticuerpos, o anticuerpos completos. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente para los Fc γ R_s, en donde se demostró que la agregación de los Fc γ R_s no induce la activación de CR3 por cambios en afinidad sino por cambios en la movilidad lateral de CR3. Estos datos indican que la agregación de CD13 induce una activación inside-out del CR3 que resulta en un cambio conformacional de la integrina a su estado de alta afinidad.

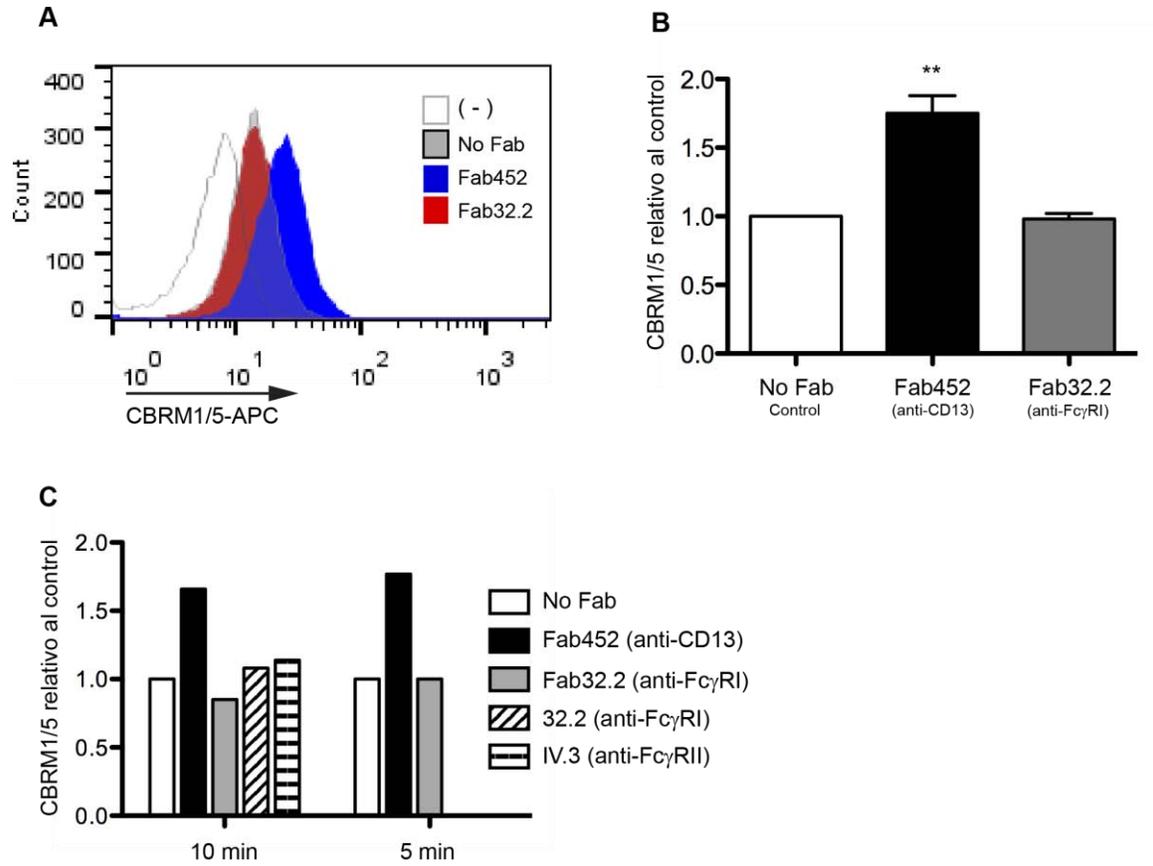


Figura 21. El entrecruzamiento de CD13 induce la activación de CR3. hMDMs se incubaron con 10 μ g de fragmentos Fab del mAb452, 10 μ g de fragmentos Fab del mAb32.2, 10 μ g del anticuerpo 32.2, 10 μ g del anticuerpo IV.3 o sin anticuerpo primario (control) por 30 min a 4°C, las células se lavaron y se incubaron con 0.8 μ g de fragmentos F(ab) $'$ 2 de IgG de cabra anti-ratón por 10 min a 4°C, seguido de una incubación a 37°C (entrecruzamiento) por 10 min (A-B) o por el tiempo indicado (C). Las células se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CBRM1/5 conjugado con APC, y se analizaron por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de un experimento. (B) Promedio de la intensidad media de fluorescencia de 7 experimentos independientes relativos al control. **p<0.005, *p<0.05 (C) Activación de CR3 por el tratamiento con los distintos anticuerpos por 5 y 10 min.

5. DISCUSIÓN

La fagocitosis es un evento mediado por receptor. Debido a que las partículas internalizadas por fagocitosis son de naturaleza extremadamente variada, no es sorprendente que un número extraordinario de receptores con distinta especificidad puedan mediar este proceso. En este trabajo se identificó a CD13 como un nuevo receptor fagocítico, capaz de internalizar partículas de manera independiente de otros receptores, y que induce vías de señalización comunes a las de otros receptores fagocíticos.

CD13 media fagocitosis de partículas tanto en la línea celular de monocitos THP-1 como en macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica. En estas células, CD13 es capaz de mediar fagocitosis en un grado similar a la fagocitosis inducida por el receptor canónico Fc γ RI, ya que en nuestro sistema experimental, tanto el porcentaje de células que internalizan, como el número de partículas internalizadas por célula, es similar para ambos receptores.

El tamaño de las partículas internalizadas a través de CD13, observadas dentro de la célula, miden $\approx 4\mu\text{m}$, lo cual apoya que CD13 induce internalización por fagocitosis y excluye otras formas de internalización. Esta observación es de importancia particular, ya que CD13 está involucrado en otras formas de internalización como en la endocitosis de coronavirus [99,100,128,152], proteínas [101], péptidos [102], o anticuerpos [99,101], en varios tipos celulares. Las formas reportadas de internalización mediadas por CD13 previamente reportadas son endocitosis mediada por caveolae [99,126] y endocitosis mediada por clatrina [100,127]. Entonces, al parecer CD13 es capaz de mediar diferentes mecanismos de endocitosis, en los cuales, tanto la naturaleza del ligando como el tipo de célula dictaría la vía de internalización. A este respecto, CD13 es similar a otros receptores fagocíticos capaces de mediar diferentes formas de internalización, las cuales dependen del tamaño de la partícula que presenta los ligandos, como es el caso de los receptores Fc γ Rs, el receptor de manosa, Dectina-1 y varios receptores scavenger.

El ligando o los ligandos naturales de CD13 capaces de inducir la fagocitosis de partículas grandes *in vivo* no se ha identificado hasta el momento, pero dado que el requerimiento inicial para inducir la señalización durante la fagocitosis es la agregación del receptor fagocítico en la membrana, proponemos que sea un ligando polivalente. Se

han identificado ligandos para CD13 tanto monovalentes como polivalentes, exógenos y endógenos. El citomegalovirus humano (hCMV) [135,136] y un importante subgrupo de coronavirus [100,130,131,133,134,153], dentro de los que se incluye el coronavirus humano 229E (HCoV-229E) [99,128,129], son los ligandos exógenos polivalentes de CD13 identificados a la fecha. La unión del HCoV-229E a fibroblastos humanos induce la agregación de CD13 en la membrana y, de relevancia para este trabajo, la agregación de CD13 inducida por el HCoV-229E tiene consecuencias idénticas a las inducidas por la agregación de CD13 por anticuerpos, en cuanto a la adhesión [105], a la formación de fibras de actina y a la distribución de CD13 en la membrana [99], lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpos es reflejo de lo que sucede con un ligando natural. Con respecto a los ligandos endógenos, un conjunto de evidencia creciente sugiere que péptidos que contienen el motivo Asn-Gly-Arg (NGR) se unen a CD13 [154,155], y se han utilizado péptidos quiméricos-NGR para quimioterapia o inmunoterapia dirigida a tumores [102,155,156]. Hay también amplia evidencia que sugiere que galectina-3 podría constituir un ligando endógeno para CD13. En ensayos de *biopanning* por *phage display* empleando cDNA de humano para identificar proteínas del proteoma humano que interactúan con CD13, el 70% de las clonas aisladas codificaron para galectina-3 [98]. En otro estudio utilizando cromatografía de afinidad para identificar ligandos de galectina-3 en fluido seminal, CD13 fue una de las 9 proteínas identificadas [157]. Además, galectina-3 co-inmunoprecipita con CD13 en células U-937 en reposo [158], y se ha mostrado que con la adición de galectina-3 a células HUVEC, CD13 y galectina-3 se co-localizan en la membrana [98]. En conjunto, estos datos sugieren que galectina-3 es un ligando endógeno probable de CD13 *in vivo*. Galectina-3 es una lectina de unión a β -galactósidos, que se expresa constitutivamente y es secretada por varios tipos celulares, incluyendo macrófagos [159]. La expresión de galectina-3 aumenta significativamente durante la diferenciación de monocitos a macrófago [160], y en el curso de varios procesos infecciosos [161-163]. Además galectina-3 está presente en cantidades considerables en el espacio extracelular en sitios de inflamación [159,162]. La galectina-3 extracelular puede funcionar en forma parácrina o autócrina para mediar interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular [164,165], migración de monocitos y macrófagos [166], y promover respuestas celulares como estallido respiratorio

[160,167,168] y fagocitosis [162,169,170]. Con relevancia para este trabajo, galectina-3 se une a los glicanos de superficie de bacterias [171-174], protista [175,176], hongos [177,178] y parásitos [170], por lo que el papel de galectina-3, como un receptor de reconocimiento de patrones se ha convertido en un área de atención intensa. La galectina-3 puede oligomerizarse formando complejos multivalentes capaces de interactuar con varios ligandos al mismo tiempo y de entrecruzar glicoproteínas de la superficie celular [179]. Por lo tanto, es tentador proponer que galectina-3 podría funcionar como una opsonina capaz de mediar la interacción de patógenos con CD13 *in vivo*. En un trabajo reciente, se ha propuesto el papel de galectina-3 como una opsonina capaz de aumentar la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos [169], planteando la posibilidad de que la dupla galectina-3-CD13 es funcional tanto en condiciones de estrés como en condiciones patogénicas. Son necesarios estudios futuros para determinar si galectina-3 puede actuar como una opsonina que promueva la fagocitosis mediada por CD13 *in vivo*.

Durante la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, las partículas opsonizadas con IgG inducen la agregación del receptor sobre la membrana celular, lo cual resulta en la fosforilación de los ITAMs en las cadenas citoplásmicas del receptor, mediada por cinasas Src. Los ITAMs fosforilados generan sitios de reclutamiento para Syk, la unión de Syk a los ITAMs fosforilados promueve su fosforilación y la activación de su actividad catalítica de cinasa. La activación de Syk es esencial para la activación de un conjunto de moléculas como PI3K, ERK, Vav y PLC γ , entre otras, que inducen los rearrreglos del citoesqueleto de actina y los eventos de remodelación de la membrana que son necesarios para la extensión del pseudópodo, el cierre de la vesícula fagosomal y finalmente la internalización de las partículas.

Nuestros resultados indican que la fagocitosis mediada por CD13 depende parcialmente de la activación de Syk, ya que el pre-tratamiento de células THP-1 o hMDMs con el inhibidor de Syk BAY 61-3606, resulta en una disminución de la fagocitosis a través de CD13. Este dato sugiere que Syk podría ser activado por la agregación de CD13 en la membrana. De hecho, mostramos que en hMDMs, el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos, resulta en una fosforilación rápida de Syk, que alcanza su pico a los 45s y que comienza a disminuir rápidamente. Esta cinética de fosforilación/desfosforilación podría explicar las diferencias entre este estudio y nuestros

estudios previos, en los cuales empleando inmunoprecipitación y western blotting, no pudimos detectar la fosforilación de Syk entre los 3 y 30 min después del entrecruzamiento de CD13 en células U-937. Posiblemente la incapacidad para detectar la fosforilación de Syk en los estudios previos se relaciona con diferencias en el tiempo de detección, el tipo celular empleado, así como en la técnica empleada [84]. Los resultados de este trabajo muestran que la agregación de CD13 induce una fosforilación rápida de Syk, y que la fagocitosis a través de CD13 posiblemente involucre la activación de Syk, así como otras cinasas tempranas que son necesarias para el reclutamiento y activación de las moléculas de señalización tardía durante la fagocitosis.

Dado que la cola citoplásmica de CD13 no posee un motivo ITAM clásico, el cómo Syk es activado después de la agregación de CD13 no es claro hasta el momento. Sin embargo, se mostró recientemente que en la línea celular monocítica U-937, el entrecruzamiento de CD13 por anticuerpos induce la fosforilación de varias proteínas, dentro de las cuales se incluyen FAK, ERK y, notablemente, la fosforilación de la tirosina de la cola citoplásmica de CD13, en una manera dependiente de Src [108]. Los inhibidores farmacológicos de Src, ERK o FAK inhiben la adhesión mediada por CD13, lo que muestra que la adhesión mediada por CD13 depende de FAK, ERK y Src. Este mismo estudio mostró que la sustitución de la tirosina de la cola citoplásmica de CD13 por una fenilalanina, inhibe la fosforilación de ERK y FAK, los rearrreglos del citoesqueleto y como consecuencia de esto, la adhesión mediada por la agregación de CD13. Esto muestra que la fosforilación en la tirosina de la cola citoplásmica de CD13 es un evento crucial durante la señalización intracelular necesaria para la adhesión mediada por CD13 [108], y es posible que este evento de fosforilación esté relacionado con la activación de Syk que nosotros observamos después de la agregación de CD13 por anticuerpos. Este trabajo también mostró que la adhesión mediada por CD13 no depende de la activación de Syk, y que el tratamiento de las células con U-937 con piceatannol (10 μ M) no afecta la adhesión [108]. Estos resultados concuerdan con nuestros resultados empleando el inhibidor de Syk BAY 61-3606 en la fagocitosis, ya que encontramos que la fagocitosis mediada por CD13 se afecta por la inhibición de Syk, sin embargo puede proceder en ausencia de la actividad de Syk. El efecto parcial de la inhibición de Syk en la fagocitosis mediada por CD13 sugiere que otras cinasas, que no se inhiben por BAY

pero que sí se inhiben por piceatannol, participan junto con Syk, en la fagocitosis mediada por CD13. La identidad de las otras cinasas involucradas en la fagocitosis mediada por CD13 no está identificada hasta el momento. Sin embargo, dado que la agregación de CD13 recluta y activa FAK, es plausible proponer que FAK podría ser responsable del reclutamiento y activación de PI3K durante la fagocitosis mediada por CD13, como se ha observado en la señalización de CR3 y otras integrinas.

La activación de PI3K es esencial para la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula que será ingerida y para cerrar el fagosoma durante la fagocitosis de la mayoría de los receptores fagocíticos conocidos. Nosotros encontramos que la fagocitosis mediada por CD13 también depende de PI3K, dado que el tratamiento de células THP-1 o hMDMs con el inhibidor de PI3K LY294002, inhibe completamente la fagocitosis mediada por CD13.

Todos los procesos fagocíticos dependen de un rearrreglo del citoesqueleto de actina controlado finamente; en este trabajo nosotros mostramos que la fagocitosis mediada por CD13 también depende del rearrreglo del citoesqueleto de actina. Estos datos concuerdan con trabajos previos, en los que se demostró que el entrecruzamiento de CD13 en la membrana por anticuerpos induce rearrreglos en el citoesqueleto de actina que llevan a la adhesión [105,108]. La fagocitosis mediada por Fc γ R y CR3 se acompañan del reclutamiento local de α -actinina [180], una proteína que puede unir filamentos de actina. De esta forma, la α -actinina puede asociar la fuerza generada por el citoesqueleto de actina a la partícula asociada a dichos receptores. A este respecto, la agregación de CD13 por anticuerpos lleva al reclutamiento de α -actinina [108], lo que sugiere que la agregación de CD13 por la partícula fagocitable también podría ligar a la partícula unida al CD13 de membrana con el citoesqueleto.

En este trabajo, comenzamos a describir los eventos de señalización involucrados en la fagocitosis mediada por CD13. Aunque queda mucho por definir, encontramos que la fagocitosis mediada por CD13 involucra la activación de Syk, así como a otras cinasas iniciadoras, la activación de PI3K y rearrreglos del citoesqueleto de actina. Dado que las vías de señalización involucradas en la fagocitosis mediada por CD13 coinciden con las vías de señalización de la mayoría de los receptores fagocíticos, es posible que *in vivo*, las señales inducidas por la agregación de CD13 sinergicen con las vías de señalización

activadas por otros receptores fagocíticos. Como se mostró *in vitro* en este trabajo, el entrecruzamiento de CD13 en la membrana 1) modula positivamente la fagocitosis a través de los FcγRs, 2) media la activación de CR3, y como se ha reportado previamente, modula positivamente la fagocitosis a través del FcγRI y de otros receptores involucrados en la fagocitosis de *E. coli* y zymosan [84,111].

La activación *inside-out* de CR3 mediada por la señalización derivada de la agregación de CD13 en la membrana, encaja con reportes previos de nuestro grupo y de otros grupos, en donde se ha descrito que el entrecruzamiento de CD13 induce adhesión en monocitos, tanto del tipo homotípico (monocito-monocito) como heterotípico (monocito-endotelial) *in vivo* e *in vitro*, y también induce mayor adhesión a diversas proteínas de matriz extracelular como fibronectina (datos del laboratorio no publicados). Dado que el entrecruzamiento de CD13 induce un estado de mayor adhesión en la célula que expresa CD13, la activación de CR3 -y posiblemente de otras integrinas- por la agregación de CD13, podría ser un componente que contribuye a este fenómeno. Queda por explorar si la activación de CR3 mediada por la agregación de CD13 en la membrana, resulta en una modulación positiva de la fagocitosis a través del CR3 como se ha mostrado para otros receptores fagocíticos.

Nuestro trabajo aporta evidencia importante de que CD13 es un receptor fagocítico primario, capaz de inducir fagocitosis independientemente de otros receptores. Demostramos que la expresión de CD13 en las células no fagocíticas HEK293 las faculta para fagocitar a través de CD13. Además, dado que estas células no expresan FcγRs (ni la mayoría de los receptores fagocíticos conocidos), estos datos soportan robustamente la noción de que CD13 es un receptor fagocítico *bona fide*. Se ha mostrado que CD13 y FcγRI se co-redistribuyen en la membrana luego del entrecruzamiento de cualquiera de los dos receptores en monocitos y macrófagos [84], por lo que existía una posibilidad preocupante: que la partícula empleada para inducir la agregación de CD13 durante la fagocitosis, también agregara al FcγRI y que internalización de partículas observada atribuida a CD13 fuera resultado en realidad de la señalización debida a la agregación del FcγRI, haciendo la fagocitosis mediada por CD13 dependiente de FcγRI. Dado que las células HEK293 no expresan FcγRs, es claro que CD13 no depende del FcγRI para mediar fagocitosis, ya que las células HEK293 que expresan CD13, internalizan

eritrocitos a través de CD13 de manera muy eficiente. Estos resultados muestran que CD13 es un receptor fagocítico primario, capaz de actuar independientemente de otros receptores fagocíticos. Sin embargo, es muy difícil descartar completamente la posibilidad de que otras moléculas de co-señalización no caracterizadas en las células HEK293, podrían estar participando en la fagocitosis mediada por CD13.

Varios tipos de receptores se activan en paralelo *in vivo*, por lo que múltiples cascadas de señalización son activadas de manera concomitante. Entonces, es posible que en escenarios naturales, en los que CD13 es expresado en la membrana de la célula junto con otros receptores fagocíticos que compartan vías de señalización comunes con CD13, la fagocitosis a través de CD13 podría regularse por otros receptores comprometidos con la presa fagocítica, como se ha mostrado que CD13 modula la fagocitosis de otros receptores [84,111] y como sucede con la mayoría de los receptores fagocíticos. Las células THP-1 y los macrófagos derivados de médula ósea de ratones deficientes de CD13, no muestran alteraciones en la fagocitosis a través de FcγRs, demostrando que aunque la agregación de CD13 aumenta la fagocitosis a través de los FcγRs, esta fagocitosis no es dependiente de CD13. De igual manera, la fagocitosis a través de CD13 no depende de FcγRI, pero podría ser regulada positivamente con la co-agregación del FcγRI y CD13.

Una de las funciones primordiales de la fagocitosis es secuestrar a la presa microbiana en un compartimento altamente especializado, el fagosoma, dentro del cual los patógenos pueden ser degradados. Un paso crucial en la maduración del fagosoma es la fusión con los lisosomas. Durante la maduración del fagosoma, componentes de la NADPH oxidasa del fagocito se ensamblan en la membrana fagosomal, llevando a la activación del estallido respiratorio y produciendo especies reactivas de oxígeno, que son compuestos antimicrobianos muy potentes [181]. En este trabajo mostramos que el entrecruzamiento de CD13 lleva a la generación de ROS, lo cual potencialmente podría promover la degradación del material internalizado a través de CD13. Aunque la detección de ROS tras el entrecruzamiento de CD13 sugiere que la internalización mediada por CD13 podría llevar a la formación de un fagosoma maduro. Es necesario explorar detalladamente si la fagocitosis mediada por CD13 lleva a la formación de un fagosoma competente.

En resumen, en este trabajo demostramos que CD13 es un receptor capaz de mediar la fagocitosis de partículas. La identificación y caracterización de esta nueva función de CD13 es una contribución importante, pues añade un miembro más a la familia de receptores con que cuentan las células monocíticas para el reconocimiento y eliminación de agentes patógenos. Será importante en estudios futuros identificar los ligandos naturales de CD13, ya sea que reconozca directamente estructuras de patógenos, o que funcione como un receptor opsónico, como lo podría sugerir algunas observaciones mencionadas arriba sobre la interacción de CD13 con Galectina-3. Asimismo, será importante determinar si la internalización de partículas a través de CD13 está asociada a funciones como la producción de citocinas, la generación de óxido nítrico, el direccionamiento de péptidos derivados de la partícula ingerida a la ruta de presentación antigénica, entre otras. Otra área importante para profundizar es la cooperación de CD13 con otros receptores. El hecho de que la señalización involucrada en la fagocitosis mediada por CD13 comparte elementos comunes con otros receptores fagocíticos, posibilita la cooperación entre CD13 y los receptores Fc γ Rs y CR3, y podría permitir la cooperación entre CD13 y otros receptores en la señalización e internalización de las partículas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (clona 452, IgG1) se purificó del sobrenadante de los cultivos del hibridoma, donado por el Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA, EUA). El anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (clona C, IgG1) se purificó del sobrenadante de los cultivos del hibridoma producido en el laboratorio. El anticuerpo monoclonal murino anti-Fc γ RI (clona 32.2, IgG1), se purificó del sobrenadante del hibridoma correspondiente, obtenido del ATCC. El anticuerpo monoclonal murino WM-15 (IgG1) fue obtenido de BioLegend (San Diego, CA, EUA). El control de isotipo IgG1 fue obtenido de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Los fragmentos Fab de los anticuerpos se prepararon con ficina inmovilizada en agarosa (Pierce, Rockford, IL, EUA). Los fragmentos F(ab) $'_2$ biotinilados del anticuerpo cabra anti-IgG de ratón (H+L) fueron obtenidos de Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y de Life Technologies (Eugene, OR). Los fragmentos F(ab) $'_2$ del anticuerpo cabra anti-IgG de ratón se compraron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA). El anticuerpo cabra anti-IgG de ratón acoplado a FITC (Fluorescein isothiocyanate) empleado como secundario para las tinciones de superficie en citometría se obtuvo de Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). El anticuerpo anti-Syk-fosforilado humano (pY348) acoplado a PE (Phycoerythrin), las soluciones Fix Buffer I y Perm Buffer II para tinciones intracelulares se obtuvieron de BD PhosflowTM (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). El anticuerpo CBRM1/5, específico para la forma activada de CD11b humana, acoplado a APC (Allophycocyanin), fue obtenido de BioLegend (San Diego, CA, EUA). El suero policlonal de conejo específico para eritrocitos de carnero fue producido en el laboratorio.

6.1.2 Reactivos

La EZ-link-sulfo-NHS-biotina se obtuvo de Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). La estreptavidina se compró de Calbiochem (San Diego, CA, USA). Los inhibidores

citocalasina D, piceatannol, BAY 61-3606 y LY294002, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). La bestatina se obtuvo de Santa Cruz Biothecnology (Santa Cruz, CA, USA). El sustrato de peptidasa (Cloridrato de L-alanina-4-nitroanilida) fue obtenido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). El marcador de membrana DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). El marcador de membrana PKH26 se obtuvo de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). El marcador celular fluorescente CFSE (Carboxyfluorescein-diacetato succinimidil ester) se obtuvo de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). El fluoróforo sensible a ROS permeable 5-(and 6-)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). Las partículas lentivirales de transducción para el silenciamiento de CD13, MISSION Lentiviral Transduction Particles, SHVRS-NM_001150 (Título de virus: >1×10⁶ TU/ml) fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). El TNBS (2,4,6-trinitrobenceno) fue obtenido de Eastman (Rochester, NY, EUA).

6.1.3 Plásmidos

Los plásmidos empacadores de lentivirus pMDLg/RRE, pRSV-Rev y pVSVGg fueron donados por el Dr. Luis Vaca (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). El vector lentiviral para la expresión de CD13 humano (hCD13/hANPEP): pLenti-suCMV(hANPEP)-Rsv(RFP-Bsd) se obtuvo de Gentarget, (San Diego, CA, EUA). El vector “vacío” de expresión, se generó mediante la eliminación de la secuencia hANPEP del vector: pLenti-suCMV(empty)-Rsv(RFP-Bsd) mediante restricción y ligación. El vector utilizado como control en los experimentos de silenciamiento pLKO.1-puro con el inserto de shRNA anti-GFP (pLKO.1-GFP-puro) fue donado por el Dr. Julián Valdés (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Los antibióticos de selección para células de mamífero, puromicina y blasticidina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA),

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Líneas celulares

Las líneas celulares THP-1 y J774 (originalmente obtenidas del ATCC, Manassas, VA, EUA) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). La línea celular HEK293 (obtenida originalmente del ATCC, Manassas, VA, EUA) se cultivó en DMEM-alto en glucosa (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). Todos los medios se suplementaron con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (todos comprados de GIBCO (Grand Island, NY, EUA)). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

6.2.2 Macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDMs)

Se obtuvieron paquetes leucocitarios de donadores sanos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, con aprobación para su uso para experimentos. Todos los experimentos en los que se emplearon células de donadores humanos fueron realizados siguiendo los Lineamientos Éticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) fueron obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica humana, como se ha descrito previamente (Montaner 1996). Las células mononucleares se aislaron de los paquetes leucocitarios de donadores sanos por gradiente de densidad utilizando una solución de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden). Las células mononucleares se lavaron cuatro veces con PBS pH 7.4 y se cultivaron en RPMI-1640 con los suplementos estándar y con 10% de suero autólogo derivado de plasma e inactivado por calor, por 30 minutos a 37°C para permitir la adhesión de los monocitos al plástico. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados, y las células adherentes, enriquecidas en monocitos (más del 90% de pureza determinada por citometría de flujo utilizando CD14 como marcador de la población monocítica) se cultivaron por 7 días en RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂. Los macrófagos

derivados de monocitos (MDMs) se cosecharon por raspado mecánico con un *gendarme*, posteriormente se lavaron y utilizaron para los experimentos.

6.2.3 Fagocitosis a través de CD13 o FcγRI (Fagocitosis Selectiva)

Preparación de las partículas fagocitables (EBS-Fabs)

Los eritrocitos de carnero se modificaron como se describió anteriormente [84]. Los eritrocitos de carnero (1.2×10^9 /ml en PBS-BSA 0.1%) se incubaron con 10 mM de CFSE, por 20 min a 37°C, posteriormente se incubaron con 25% de SFB por 15 min a 37°C y se lavaron. Los eritrocitos marcados con CFSE se incubaron con 250 µg/ml de sulfo-NHS-biotina por 20 min a 4°C. Después de lavarlos, se cubrieron con 35 µg/ml de estreptavidina mediante una incubación de 20 min a 4°C. Posteriormente, los eritrocitos cubiertos con biotina-estreptavidina, se lavaron e incubaron con fragmentos F(ab)₂ biotinilados de cabra anti-IgG de ratón por 30 min a 4°C, y se lavaron. Los eritrocitos marcados con CFSE y cubiertos con biotina-streptavidina y fragmentos F(ab)₂ biotinilados de cabra anti-IgG de ratón se designaron EBS-Fabs (por sus siglas en inglés: *Erythrocyte Biotin Streptavidin-Fabs*).

Ensayos de Fagocitosis Selectiva

1×10^6 de hMDMs o THP-1 se incubaron con 2 µg de los fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), o con 8 µg de los fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI), o con 8 µg de IgG1 (control de isotipo), o sin tratamiento (control) por 30 min a 4°C, las células se lavaron para retirar los fragmentos Fab no unidos a las células. A continuación, las células se incubaron con los EBS-Fabs en una relación de 1 célula: 20 EBS-Fabs, a 37°C por 45 min para los hMDMs o por 1h 45 min para las células THP-1. Se mantuvieron muestras idénticas a 4°C como control. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico. La fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo utilizando el equipo Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) o el equipo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) en presencia de Azul Trypano al 0.02% en PBS (pH 4.5) para apagar cualquier fluorescencia extracelular

remanente y diferenciar entre eritrocitos adheridos a la célula y eritrocitos internalizados por las células. Los datos se expresan como el porcentaje de células CFSE-positivas (células que han internalizado cuando menos un eritrocito). En los experimentos en donde se evaluó el efecto de los inhibidores farmacológicos de cinasas o de polimerización de actina, los MDMs o las células THP-1 se pre-incubaron por 2h a 37°C, con 50 µM de Piceatannol, 50 µM de LY294002, 200 nM de Citocalasina D, 1 o 10 µM de BAY 61-3606, o con DMSO como control del vehículo, y el ensayo de fagocitosis procedió como se describió anteriormente, siempre en presencia del inhibidor. Para los experimentos en los que se evaluó el efecto del inhibidor de la actividad enzimática de CD13, las células THP-1 se pre-incubaron por 40 min a 37°C con bestatina a 4 µg/ml, y el ensayo de fagocitosis prosiguió como se describió anteriormente, siempre en presencia del inhibidor. Para la microscopía confocal, las células se marcaron previamente al ensayo de fagocitosis con PKH26 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) o posteriormente al ensayo de fagocitosis con DiI (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células fueron examinadas en un microscopio confocal Zeiss LSM5.

Ensayos de Fagocitosis Selectiva Modificada

Para los ensayos de fagocitosis selectiva con las células J774 y HEK293, los EBS-Fabs se incubaron con los fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), con los fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI) o con PBS-BSA (referidos de ahora en adelante como E-Fab452, E-Fab32.2 o Ec, respectivamente) por 40 min a 4°C. Después de lavarlos, los E-Fab452, E-Fab32.2 o Ec se mezclaron con las células sin tratamiento en una relación de 1 célula: 20 E-Fab452, E-Fab32.2 o Ec y se incubaron a 37°C por 1h 45 min. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por choque hipotónico y la fagocitosis se analizó por citometría de flujo como se describió previamente. Las células se examinaron también en un microscopio confocal Zeiss LSM5.

6.2.4 Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática de CD13 se midió por determinación colorimétrica de la hidrólisis del sustrato clorhidrato de L-alanina-4-nitroanilida, como ha descrito previamente (Ashmun, 1992). Brevemente, 1×10^6 de células THP-1 se pre-incubaron con

4 µg/ml de bestatina por 40 min a 37°C, seguidos por una incubación de 30 min a 4°C. Posteriormente, estas células se lavaron y se incubaron con bestatina por 1 h a 37°C. El sustrato se añadió a una concentración final de 6 mM y las células se incubaron por 45 min a 37°C. La absorbancia a 405 nm se determinó inmediatamente.

Para la determinación del efecto de los diferentes mAbs en la actividad enzimática de CD13, los MDMs se incubaron en hielo por 30 min con los diferentes fragmentos Fab (Fab452, Fab C o Fab 32.2), anticuerpos (WM-15 o IgG1) o bestatina a 4, 40 o 400 µg/ml. Las células se lavaron y se incubaron por 1h 45 min a 37°C, el sustrato se añadió durante los últimos 45 min de incubación a 37°C, la absorbancia a 405 nm se determinó inmediatamente.

Los datos son presentados como el porcentaje del control y representan el promedio de las absorbancias obtenidas en por lo menos cuatro experimentos independientes normalizados para el control de células incubadas sin ningún anticuerpo o bestatina antes de añadir el sustrato.

6.2.5 Detección de la fosforilación de Syk inducida por entrecruzamiento de CD13 o FcγRI en hMDMs

Los cultivos de MDMs se mantuvieron en medio mínimo (RPMI con los suplementos estándar y 0.5% de SFB) por 4 h previas al experimento. A continuación, 1×10^6 de MDMs se incubaron con fragmentos Fab del mAb452 anti-CD13 (4 µg), fragmentos Fab del mAb32.2 anti-FcγRI (10 µg), anti-FcγRI (10 µg), anti-FcγRI (10 µg), o sin anticuerpo primario por 30 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab)₂ de IgG de cabra anti-ratón por 10 min a 4°C, seguido de una incubación a 37°C (entrecruzamiento) por el tiempo indicado en medio completo. La señalización se detuvo por fijación en Fix Buffer I (BD Phosflow™ BD Biosciences, San Diego, CA) por 10 min a 37°C, seguido de lavado y permeabilización en Perm Buffer II BD Phosflow, por 40 min a 4°C. Las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-pSyk acoplado a PE por 1h en hielo. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.6 Producción de las partículas lentivirales

Producción de plásmidos

Los plásmidos pMDLg/RRE, pRSV-Rev, pVSVGg, pLKO.1-GFP-puro, pLenti-suCMV(hANPEP)-Rsv(RFP-Bsd) y pLenti-suCMV(empty)-Rsv(RFP-Bsd) fueron electroporados en bacterias competentes *E.coli* DH5 α . Las bacterias transfectadas se cultivaron a 29°C en medio de selección con ampicilina a 100 μ g/ml. Los plásmidos se obtuvieron por lisis alcalina y precipitación con isopropanol.

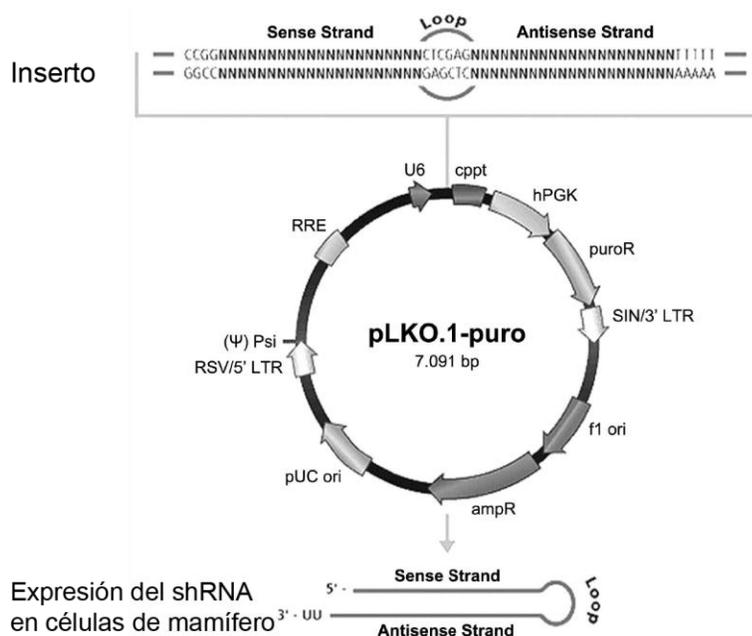
Producción de las partículas lentivirales

Las partículas lentivirales fueron producidas por transfección transitoria de células HEK293T de acuerdo a protocolos estándar. Para maximizar la bioseguridad, se empleó un sistema de empaquetamiento de tercera generación. Las células HEK293T subconfluentes se co-transfectaron con 20 μ g del plásmido vector, 15 μ g de pMDLg/RRE, 15 μ g de pRSV-Rev y 15 μ g de pVSVGg por precipitación con fosfato de calcio. Los sobrenadantes conteniendo las partículas lentivirales se cosecharon a las 36 h posteriores a la transfección. Las partículas lentivirales se concentraron por ultracentrifugación y se usaron inmediatamente para la transducción de las células.

Partículas lentivirales para el silenciamiento de CD13

Las partículas lentivirales de transducción para el silenciamiento de CD13, MISSION Lentiviral Transduction Particles, SHVRS-NM_00115) contienen las secuencias para el silenciamiento de CD13 shRNA L1-L5 clonadas en el vector de expresión en mamíferos pLKO.1-puro que confiere resistencia a puomicina bajo el promotor hPGK, expresión del inserto de siRNA bajo el promotor U6, y las secuencias PPT y LTR que median la integración del plásmido vector al DNA, generando así líneas estables (Figura Materiales y Métodos 1A). Las secuencias clonadas en el plásmido vector para el silenciamiento de CD13 (TRCN0000050238, TRCN0000050239, TRCN0000050240, TRCN0000050241, TRCN0000050242) se muestran en la Figura 1B (Figura Materiales y Métodos 1B). Para producir las partículas lentivirales control para estos experimentos se empleó el plásmido pLKO.1-puro con un inserto de siRNA anti-GFP bajo el promotor U6.

A



B

Secuencia del inserto	
L1	CCGGCCCTCTTCATTCACCTCAGAACTCGAGTTCTGAAGTGAATGAAGAGGGTTTTTG
L2	CCGGCCTCAATGTGACGGGCTATTACTCGAGTAATAGCCCGTCACATTGAGGTTTTTG
L3	CCGGCCTGAGCTACTTCAAGCTCATCTCGAGATGAGCTTGAAGTAGCTCAGGTTTTTG
L4	CCGGCCACAGCAAGAAGCTCAACTACTCGAGTAGTTGAGCTTCTTGCTGTGGTTTTTG
L5	CCGGGTGACCATAGAGTGGTGGAAATCTCGAGATTCCACCACTCTATGGTCACTTTTTG
C+	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG

Figura Materiales y Métodos 1. Vector y secuencias empleadas en los experimentos de silenciamiento de CD13. (A) Vector pLKO.1 (B) Secuencias de los shRNA anti-CD13 y control clonados en el vector pLKO.1.

6.2.7 Silenciamiento de la expresión de CD13 en células THP-1 mediante lentivirus shRNA

Células THP-1 a una confluencia del 70% en placas de 96 pozos se infectaron con partículas lentivirales con cinco secuencias anti-CD13 diferentes para silenciar la expresión de CD13 humano o con las partículas control. Examinamos la eficiencia de silenciamiento de las cinco clonas cuyo blanco es CD13 o de las partículas control de transducción (GFP-target shRNA, producidas en nuestro laboratorio). Las células THP-1 se incubaron toda la noche con las partículas lentivirales y 8 µg/ml de polibreno. Después

de la incubación, el medio que contenía a las partículas lentivirales se reemplazó con medio fresco. A partir del segundo día después de la infección, se añadió medio de selección con 2.5 µg/ml de puomicina a los cultivos por los siguientes dos meses. Se determinó el silenciamiento de CD13 por citometría de flujo. De las cinco clonas probadas, la clona TRCN0000050239 mostró la mejor eficiencia de silenciamiento. Se seleccionaron a las células transducidas con la clona TRCN0000050239 para los experimentos de este trabajo (referidas como células L2 en adelante).

6.2.8 Generación de líneas celular con expresión estable de hCD13

Cultivos de células J774 o HEK293 en medio completo a una confluencia del 70% en placas de 12 pozos se transdujeron con partículas lentivirales concentradas de suCMV(hANPEP)-Rsv(RFP-Bsd) o suCMV(Empty)-Rsv(RFP-Bsd) con 8 µg/ml de polybreno. Después de 18 horas de incubación con las partículas lentivirales, el medio se reemplazo con medio fresco. A partir del tercer día después de la transducción, se añadió el medio de selección con blasticidina a 2.5 y 10 µg/ml para las células J774 y HEK293 respectivamente. La expresión de hCD13 en la membrana se determinó por citometría de flujo, mientras que la expresión citosólica de RFP se determinó por microscopía confocal.

6.2.9 Cuantificación de la producción de ROS

0.5×10^6 células J774 con expresión estable de CD13 (R3) o células J774 control (M3) se pre-cargaron CM-H₂DCFDA por 20 min a 37°C en HBSS-BSA 0.1% con calcio y magnesio. Después de lavar a las células, CD13 se entrecruzó por 30 min a 37°C, como se describió anteriormente para la determinación de la fosforilación de Syk en MDMs, o se incubaron con PMA como control. Las células se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

6.2.10 Ensayos de fagocitosis a través de FcγRs con entrecruzamiento simultáneo de CD13 por anticuerpos

Preparación de las partículas fagocitables

Una suspensión de eritrocitos de carnero a 1.2×10^9 /ml en PBS-BSA 0.1%) se marcaron con CFSE como se describió anteriormente. A continuación, los eritrocitos marcados con CFSE fueron incubados con TNBS 1.5mM en buffer de boratos (0.2 M de ácido bórico, 0.15 M de NaCl, pH 8.5) por 10 min a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación moderada. Posteriormente los eritrocitos se lavaron, se resuspendieron en DGVB y el total de eritrocitos se dividieron en dos alícuotas equitativas ($\approx 0.6 \times 10^9$). Se adicionó el anticuerpo policlonal de conejo anti-DNP a una alícuota (eritrocitos opsonizados con IgG), mientras que la otra alícuota se dejó sin tratamiento (eritrocitos sin opsonizar), y se incubaron en hielo y en oscuridad por 30 min. Los eritrocitos se lavaron y resuspendieron en DGVB.

Ensayos de fagocitosis

0.5×10^6 células THP-1 se incubaron con 0.01, 0.1, 1 ó 10 µg de fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13) o sin anticuerpo primario, por 30 min a 4°C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab)'₂ de IgG de cabra anti-ratón por 30 min a 4°C y se lavaron. A continuación, las células se incubaron con los eritrocitos-sin opsonizar o con los eritrocitos-opsonizados en una relación de una célula monocítica: 20 eritrocitos, a 37°C por 2h 30 min. Se mantuvieron muestras idénticas a 4°C como control. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por shock hipotónico. La fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo.

6.2.11 Activación de CD11b inducida por el entrecruzamiento de CD13 por anticuerpos

1×10^6 de hMDMs se incubaron con fragmentos Fab del mAb452 anti-CD13 (4 µg), fragmentos Fab del mAb32.2 anti-FcγRI (10 µg), anti-FcγRI (10 µg), anti-FcγRI (10 µg), o sin anticuerpo primario por 30 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab)'₂ de IgG de cabra anti-ratón por 10 min a 4°C, seguido

de una incubación a 37°C (entrecruzamiento) por el tiempo indicado en medio completo. La activación se detuvo por fijación en Fix Buffer I BD Phosflow, por 10 min a 37°C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo CBRM1/5, que reconoce la conformación activada de la integrina, por 1h en hielo. Las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.12 Citometría de flujo

Para analizar la expresión de CD13 o FcγRI en la superficie de la célula, las líneas celulares (THP-1, J774 o HEK293) y los MDMs. 1×10^6 de células se incubaron con 2 μg de los fragmentos Fab del mAb452 (anti-CD13), o con 8 μg de los fragmentos Fab del mAb32.2 (anti-FcγRI), o con 8 μg de IgG1 (control de isotipo), o anticuerpo primario por 30 min a 4°C. A continuación se lavaron e incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC por 20 min a 4°C. Las células se lavaron y se fijaron con PFA al 1% en PBS y se analizaron por citometría de flujo. Para los experimentos de evaluación de la expresión de moléculas en la superficie de la célula, fagocitosis selectiva, fosforilación de Syk, producción de ROS, fagocitosis a través de los FcγRs y activación de CD11b, la intensidad media de fluorescencia de 15,000 células se midió por citometría de flujo.

6.2.13 Análisis Estadístico

Las gráficas presentadas contienen cuando menos cuatro experimentos independientes. Los datos están presentados como los valores de media ± SEM. Los datos se analizaron utilizando la prueba de t de Student's pareada de dos colas. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Flannagan, R. S., Jaumouille, V., Grinstein, S. (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* 7, 61-98.
2. Doherty, G. J. and McMahon, H. T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78, 857-902.
3. Garcia-Garcia, E. and Rosales, C. (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of leukocyte biology* 72, 1092-108.
4. Freeman, S. A. and Grinstein, S. (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological reviews* 262, 193-215.
5. Clemens, D. L. and Horwitz, M. A. (1992) Membrane sorting during phagocytosis: selective exclusion of major histocompatibility complex molecules but not complement receptor CR3 during conventional and coiling phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 175, 1317-26.
6. Pierini, L., Holowka, D., Baird, B. (1996) Fc epsilon RI-mediated association of 6-micron beads with RBL-2H3 mast cells results in exclusion of signaling proteins from the forming phagosome and abrogation of normal downstream signaling. *The Journal of cell biology* 134, 1427-39.
7. Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., Aderem, A. A., Soldati, T., Cosson, P., Letourneur, F. (2004) Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Molecular biology of the cell* 15, 861-9.
8. Mercanti, V., Charette, S. J., Bennett, N., Ryckewaert, J. J., Letourneur, F., Cosson, P. (2006) Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *Journal of cell science* 119, 4079-87.
9. Flannagan, R. S., Canton, J., Furuya, W., Glogauer, M., Grinstein, S. (2014) The phosphatidylserine receptor TIM4 utilizes integrins as coreceptors to effect phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 25, 1511-22.
10. Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S., Bonventre, J. V. (2008) Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* 118, 1657-68.

11. Monks, J., Rosner, D., Geske, F. J., Lehman, L., Hanson, L., Neville, M. C., Fadok, V. A. (2005) Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell death and differentiation* 12, 107-14.
12. Indik, Z., Kelly, C., Chien, P., Levinson, A. I., Schreiber, A. D. (1991) Human Fc gamma RII, in the absence of other Fc gamma receptors, mediates a phagocytic signal. *The Journal of clinical investigation* 88, 1766-71.
13. Brown, G. D. and Gordon, S. (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-7.
14. Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., Gordon, S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology* 23, 901-44.
15. Ross, G. D., Reed, W., Dalzell, J. G., Becker, S. E., Hogg, N. (1992) Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *Journal of leukocyte biology* 51, 109-17.
16. Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J., Hook, M. (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *European journal of cell biology* 79, 672-9.
17. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Nagata, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-7.
18. Kristof, E., Zahuczky, G., Katona, K., Doro, Z., Nagy, E., Fesus, L. (2013) Novel role of ICAM3 and LFA-1 in the clearance of apoptotic neutrophils by human macrophages. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 18, 1235-51.
19. Thomas, C. A., Li, Y., Kodama, T., Suzuki, H., Silverstein, S. C., El Khoury, J. (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 191, 147-56.

20. Erdman, L. K., Cosio, G., Helmers, A. J., Gowda, D. C., Grinstein, S., Kain, K. C. (2009) CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol* 183, 6452-9.
21. van der Laan, L. J., Dopp, E. A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C. D., Gordon, S., Tryggvason, K., Kraal, G. (1999) Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol* 162, 939-47.
22. Vachon, E., Martin, R., Plumb, J., Kwok, V., Vandivier, R. W., Glogauer, M., Kapus, A., Wang, X., Chow, C. W., Grinstein, S., Downey, G. P. (2006) CD44 is a phagocytic receptor. *Blood* 107, 4149-58.
23. Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., Hauck, C. R. (2004) Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *The Journal of experimental medicine* 199, 35-46.
24. Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S. A., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W. C., Lane, T. F., Cheng, G. (2004) Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *The Journal of experimental medicine* 199, 81-90.
25. Geijtenbeek, T. B. and Gringhuis, S. I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology* 9, 465-79.
26. Hoving, J. C., Wilson, G. J., Brown, G. D. (2014) Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology* 16, 185-94.
27. Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A. (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 1785-94.
28. Herre, J., Marshall, A. S., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., Brown, G. D. (2004) Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038-45.

29. Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T., Gordon, S. (2000) Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infection and immunity* 68, 1953-63.
30. Le Cabec, V., Emorine, L. J., Toesca, I., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I. (2005) The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *Journal of leukocyte biology* 77, 934-43.
31. Anderson, C. L., Shen, L., Eicher, D. M., Wewers, M. D., Gill, J. K. (1990) Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 171, 1333-45.
32. Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D. M., Jinushi, M., Umetsu, S. E., Butte, M. J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., Sharpe, A. H., Ito, S., Dranoff, G., Kaplan, G. G., Casasnovas, J. M., Umetsu, D. T., Dekruyff, R. H., Freeman, G. J. (2007) TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27, 927-40.
33. Park, D., Tosello-Tramont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W., Ravichandran, K. S. (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450, 430-4.
34. Park, S. Y., Jung, M. Y., Kim, H. J., Lee, S. J., Kim, S. Y., Lee, B. H., Kwon, T. H., Park, R. W., Kim, I. S. (2008) Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell death and differentiation* 15, 192-201.
35. Canton, J., Neculai, D., Grinstein, S. (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature reviews. Immunology* 13, 621-34.
36. Humphries, J. D., Byron, A., Humphries, M. J. (2006) Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* 119, 3901-3.
37. Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E., Meyer, T. F. (2002) Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* 21, 560-71.

38. Vachon, E., Martin, R., Kwok, V., Cherepanov, V., Chow, C. W., Doerschuk, C. M., Plumb, J., Grinstein, S., Downey, G. P. (2007) CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages. *Blood* 110, 4492-502.
39. Dupuy, A. G. and Caron, E. (2008) Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *Journal of cell science* 121, 1773-83.
40. Underhill, D. M. and Goodridge, H. S. (2012) Information processing during phagocytosis. *Nature reviews. Immunology* 12, 492-502.
41. Champion, J. A. and Mitragotri, S. (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4930-4.
42. Beningo, K. A. and Wang, Y. L. (2002) Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *Journal of cell science* 115, 849-56.
43. Swanson, J. A. (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 639-49.
44. Cox, D., Tseng, C. C., Bjekic, G., Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *The Journal of biological chemistry* 274, 1240-7.
45. Sulahian, T. H., Imrich, A., Deloid, G., Winkler, A. R., Kobzik, L. (2008) Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respiratory research* 9, 59.
46. Newman, S. L., Mikus, L. K., Tucci, M. A. (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 146, 967-74.
47. Jones, D. H., Nusbacher, J., Anderson, C. L. (1985) Fc receptor-mediated binding and endocytosis by human mononuclear phagocytes: monomeric IgG is not endocytosed by U937 cells and monocytes. *The Journal of cell biology* 100, 558-64.

48. Odin, J. A., Edberg, J. C., Painter, C. J., Kimberly, R. P., Unkeless, J. C. (1991) Regulation of phagocytosis and $[Ca^{2+}]_i$ flux by distinct regions of an Fc receptor. *Science* 254, 1785-8.
49. Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., Fleit, H. B. (1995) Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *The Biochemical journal* 305 (Pt 2), 669-74.
50. Wang, A. V., Scholl, P. R., Geha, R. S. (1994) Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn. *The Journal of experimental medicine* 180, 1165-70.
51. Hamada, F., Aoki, M., Akiyama, T., Toyoshima, K. (1993) Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6305-9.
52. Johnson, S. A., Pleiman, C. M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., Cambier, J. C. (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 155, 4596-603.
53. Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L., DeFranco, A. L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *The Journal of experimental medicine* 186, 1027-39.
54. Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., Pawson, T. (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Molecular and cellular biology* 18, 4209-20.
55. Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A., Simmons, R. M. (2005) Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106, 2543-50.
56. Shi, Y., Tohyama, Y., Kadono, T., He, J., Miah, S. M., Hazama, R., Tanaka, C., Tohyama, K., Yamamura, H. (2006) Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood* 107, 4554-62.

57. Berton, G., Mocsai, A., Lowell, C. A. (2005) Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in immunology* 26, 208-14.
58. Mocsai, A., Abram, C. L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L. L., Lowell, C. A. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature immunology* 7, 1326-33.
59. Tridandapani, S., Lyden, T. W., Smith, J. L., Carter, J. E., Coggeshall, K. M., Anderson, C. L. (2000) The adapter protein LAT enhances fcgamma receptor-mediated signal transduction in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 20480-7.
60. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., Samelson, L. E. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
61. Lee, W. L., Cosio, G., Ireton, K., Grinstein, S. (2007) Role of CrkII in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 282, 11135-43.
62. Botelho, R. J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J. D., Meyer, T., Grinstein, S. (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *The Journal of cell biology* 151, 1353-68.
63. Larsen, E. C., Ueyama, T., Brannock, P. M., Shirai, Y., Saito, N., Larsson, C., Loegering, D., Weber, P. B., Lennartz, M. R. (2002) A role for PKC-epsilon in Fc gammaR-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells. *The Journal of cell biology* 159, 939-44.
64. Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M. (1994) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 269, 22732-7.
65. Marshall, J. G., Booth, J. W., Stambolic, V., Mak, T., Balla, T., Schreiber, A. D., Meyer, T., Grinstein, S. (2001) Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology* 153, 1369-80.

66. Araki, N., Johnson, M. T., Swanson, J. A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology* 135, 1249-60.
67. Caron, E. and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-21.
68. Park, H. and Cox, D. (2009) Cdc42 regulates Fc gamma receptor-mediated phagocytosis through the activation and phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and neural-WASP. *Molecular biology of the cell* 20, 4500-8.
69. Lutz, M. A. and Correll, P. H. (2003) Activation of CR3-mediated phagocytosis by MSP requires the RON receptor, tyrosine kinase activity, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C zeta. *Journal of leukocyte biology* 73, 802-14.
70. May, R. C., Caron, E., Hall, A., Machesky, L. M. (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc gamma R or CR3. *Nature cell biology* 2, 246-8.
71. Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17, 593-623.
72. Groves, E., Dart, A. E., Covarelli, V., Caron, E. (2008) Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 1957-76.
73. Brown, E. J., Bohnsack, J. F., Gresham, H. D. (1988) Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *The Journal of clinical investigation* 81, 365-75.
74. Ehlenberger, A. G. and Nussenzweig, V. (1977) The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 145, 357-71.
75. Kusunoki, T., Tsuruta, S., Higashi, H., Hosoi, S., Hata, D., Sugie, K., Mayumi, M., Mikawa, H. (1994) Involvement of CD11b/CD18 in enhanced neutrophil adhesion by Fc gamma receptor stimulation. *Journal of leukocyte biology* 55, 735-42.

76. Schreiber, A. D., Parsons, J., McDermott, P., Cooper, R. A. (1975) Effect of corticosteroids on the human monocyte IgG and complement receptors. *The Journal of clinical investigation* 56, 1189-97.
77. Tang, T., Rosenkranz, A., Assmann, K. J., Goodman, M. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Carroll, M. C., Cotran, R. S., Mayadas, T. N. (1997) A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc γ receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *The Journal of experimental medicine* 186, 1853-63.
78. van Spruiel, A. B., van Ojik, H. H., Bakker, A., Jansen, M. J., van de Winkel, J. G. (2003) Mac-1 (CD11b/CD18) is crucial for effective Fc receptor-mediated immunity to melanoma. *Blood* 101, 253-8.
79. Jongstra-Bilen, J., Harrison, R., Grinstein, S. (2003) Fc γ -receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 45720-9.
80. Krauss, J. C., PooH, Xue, W., Mayo-Bond, L., Todd, R. F., 3rd, Petty, H. R. (1994) Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol* 153, 1769-77.
81. Worth, R. G., Mayo-Bond, L., van de Winkel, J. G., Todd, R. F., 3rd, Petty, H. R. (1996) CR3 (alphaM beta2; CD11b/CD18) restores IgG-dependent phagocytosis in transfectants expressing a phagocytosis-defective Fc gammaRIIA (CD32) tail-minus mutant. *J Immunol* 157, 5660-5.
82. Gresham, H. D., Graham, I. L., Anderson, D. C., Brown, E. J. (1991) Leukocyte adhesion-deficient neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation. Evidence for CD11b/CD18-dependent and -independent mechanisms of phagocytosis. *The Journal of clinical investigation* 88, 588-97.
83. Mina-Osorio, P. and Ortega, E. (2004) Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes? *Trends in immunology* 25, 529-35.

84. Mina-Osorio, P. and Ortega, E. (2005) Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes. *Journal of leukocyte biology* 77, 1008-17.
85. Imamura, N. and Kimura, A. (2000) Effect of ubenimex (Bestatin) on the cell growth and phenotype of HL-60 and HL-60R cell lines: up- and down-regulation of CD13/aminopeptidase N. *Leukemia & lymphoma* 37, 663-7.
86. Lendeckel, U., Arndt, M., Frank, K., Wex, T., Ansorge, S. (1999) Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *International journal of molecular medicine* 4, 17-27.
87. Wex, T., Lendeckel, U., Reinhold, D., Kahne, T., Arndt, M., Frank, K., Ansorge, S. (1997) Antisense-mediated inhibition of aminopeptidase N (CD13) markedly decreases growth rates of hematopoietic tumour cells. *Advances in experimental medicine and biology* 421, 67-73.
88. Lohn, M., Mueller, C., Langner, J. (2002) Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leukemia & lymphoma* 43, 407-13.
89. Lohn, M., Mueller, C., Thiele, K., Kahne, T., Riemann, D., Langner, J. (1997) Aminopeptidase N-mediated signal transduction and inhibition of proliferation of human myeloid cells. *Advances in experimental medicine and biology* 421, 85-91.
90. Chen, L., Gao, Z., Zhu, J., Rodgers, G. P. (2007) Identification of CD13⁺CD36⁺ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Experimental hematology* 35, 1047-55.
91. Rosenzweig, M., Tailleux, L., Gluckman, J. C. (2000) CD13/N-aminopeptidase is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34(+) cells. *Blood* 95, 453-60.
92. Proost, P., Mortier, A., Loos, T., Vandercappellen, J., Gouwy, M., Ronsse, I., Schutyser, E., Put, W., Parmentier, M., Struyf, S., Van Damme, J. (2007) Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* 110, 37-44.

93. Wulfaenger, J., Niedling, S., Riemann, D., Seliger, B. (2008) Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion. *Molecular membrane biology* 25, 72-82.
94. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., Azuma, I. (1993) Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 54, 137-43.
95. Pereira, F. E., Cronin, C., Ghosh, M., Zhou, S. Y., Agosto, M., Subramani, J., Wang, R., Shen, J. B., Schacke, W., Liang, B., Yang, T. H., McAulliffe, B., Liang, B. T., Shapiro, L. H. (2013) CD13 is essential for inflammatory trafficking and infarct healing following permanent coronary artery occlusion in mice. *Cardiovascular research* 100, 74-83.
96. Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L. H. (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97, 652-9.
97. Dondossola, E., Rangel, R., Guzman-Rojas, L., Barbu, E. M., Hosoya, H., St John, L. S., Molldrem, J. J., Corti, A., Sidman, R. L., Arap, W., Pasqualini, R. (2013) CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20717-22.
98. Yang, E., Shim, J. S., Woo, H. J., Kim, K. W., Kwon, H. J. (2007) Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications* 363, 336-41.
99. Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T. (2004) Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *Journal of virology* 78, 8701-8.
100. Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H., Noren, O. (1998) The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes

- infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *Journal of virology* 72, 527-34.
101. Melkebeek, V., Rasschaert, K., Bellot, P., Tilleman, K., Favoreel, H., Deforce, D., De Geest, B. G., Goddeeris, B. M., Cox, E. (2012) Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response. *Mucosal immunology* 5, 635-45.
 102. Svensen, N., Walton, J. G., Bradley, M. (2012) Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends in pharmacological sciences* 33, 186-92.
 103. Petrovic, N., Schacke, W., Gahagan, J. R., O'Connor, C. A., Winnicka, B., Conway, R. E., Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H. (2007) CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* 110, 142-50.
 104. Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H., Ortega, E. (2006) CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *Journal of leukocyte biology* 79, 719-30.
 105. Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O'Connor, C., Grant, C. L., Vogel, L. K., Rodriguez-Pinto, D., Holmes, K. V., Ortega, E., Shapiro, L. H. (2008) CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *Journal of leukocyte biology* 84, 448-59.
 106. Rahman, M. M., Ghosh, M., Subramani, J., Fong, G. H., Carlson, M. E., Shapiro, L. H. (2013) CD13 regulates anchorage and differentiation of the skeletal muscle satellite stem cell population in ischemic injury. *Stem Cells*.
 107. Rahman, M. M., Subramani, J., Ghosh, M., Denninger, J. K., Takeda, K., Fong, G. H., Carlson, M. E., Shapiro, L. H. (2014) CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. *Front Physiol* 4, 402.
 108. Subramani, J., Ghosh, M., Rahman, M. M., Caromile, L. A., Gerber, C., Rezaul, K., Han, D. K., Shapiro, L. H. (2013) Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking. *J Immunol* 191, 3905-12.
 109. 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. *The Journal of experimental medicine* 184, 183-9.
110. Ghosh, M., McAuliffe, B., Subramani, J., Basu, S., Shapiro, L. H. (2012) CD13 regulates dendritic cell cross-presentation and T cell responses by inhibiting receptor-mediated antigen uptake. *J Immunol* 188, 5489-99.
 111. Villasenor-Cardoso, M. I., Frausto-Del-Rio, D. A., Ortega, E. (2013) Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *Biomed Res Int* 2013, 562984.
 112. Kanayama, N., Kajiwara, Y., Goto, J., el Maradny, E., Maehara, K., Andou, K., Terao, T. (1995) Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *Journal of leukocyte biology* 57, 129-34.
 113. Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cellular immunology* 201, 22-32.
 114. Hoffmann, T., Faust, J., Neubert, K., Ansorge, S. (1993) Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS letters* 336, 61-4.
 115. Mina-Osorio, P. (2008) The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med* 14, 361-71.
 116. Riemann, D., Kehlen, A., Langner, J. (1999) CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunology today* 20, 83-8.
 117. Navarrete Santos, A., Roentsch, J., Danielsen, E. M., Langner, J., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 269, 143-8.
 118. Riemann, D., Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L., Thorsen, E., Immerdal, L., Santos, A. N., Kehlen, A., Langner, J., Danielsen, E. M. (2001) Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. *The Biochemical journal* 354, 47-55.
 119. Orso, E., Werner, T., Wolf, Z., Bandulik, S., Kramer, W., Schmitz, G. (2006) Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human

- monocytes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 69, 206-8.
120. Wong, A. H., Zhou, D., Rini, J. M. (2012) The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *The Journal of biological chemistry* 287, 36804-13.
 121. Kochan, G., Krojer, T., Harvey, D., Fischer, R., Chen, L., Vollmar, M., von Delft, F., Kavanagh, K. L., Brown, M. A., Bowness, P., Wordsworth, P., Kessler, B. M., Oppermann, U. (2011) Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7745-50.
 122. Xu, Y., Wellner, D., Scheinberg, D. A. (1995) Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/aminopeptidase N. *Biochemical and biophysical research communications* 208, 664-74.
 123. Shipp, M. A. and Look, A. T. (1993) Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 82, 1052-70.
 124. Lendeckel, U., Kahne, T., Riemann, D., Neubert, K., Arndt, M., Reinhold, D. (2000) Review: the role of membrane peptidases in immune functions. *Advances in experimental medicine and biology* 477, 1-24.
 125. Gredmark, S., Britt, W. B., Xie, X., Lindbom, L., Soderberg-Naucler, C. (2004) Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13. *J Immunol* 173, 4897-907.
 126. Miki, T., Takegami, Y., Okawa, K., Muraguchi, T., Noda, M., Takahashi, C. (2007) The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *The Journal of biological chemistry* 282, 12341-52.
 127. Ait-Slimane, T., Galmes, R., Trugnan, G., Maurice, M. (2009) Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Molecular biology of the cell* 20, 3792-800.

128. Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., Holmes, K. V. (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357, 420-2.
129. Lachance, C., Arbour, N., Cashman, N. R., Talbot, P. J. (1998) Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *Journal of virology* 72, 6511-9.
130. Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H. (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357, 417-20.
131. Delmas, B., Gelfi, J., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H. (1993) Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Advances in experimental medicine and biology* 342, 293-8.
132. Tresnan, D. B., Levis, R., Holmes, K. V. (1996) Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *Journal of virology* 70, 8669-74.
133. Tusell, S. M., Schittone, S. A., Holmes, K. V. (2007) Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *Journal of virology* 81, 1261-73.
134. Wentworth, D. E. and Holmes, K. V. (2001) Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *Journal of virology* 75, 9741-52.
135. Larsson, S., Soderberg-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, 411-5.
136. Soderberg, C., Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson, S., Wahlberg, J. M., Moller, E. (1993) CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 67, 6576-85.
137. Tokuda, N. and Levy, R. B. (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, 244-50.

138. Riemann, D., Tcherkes, A., Hansen, G. H., Wulfaenger, J., Blosz, T., Danielsen, E. M. (2005) Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 1408-12.
139. Jozefowski, S., Yang, Z., Marcinkiewicz, J., Kobzik, L. (2012) Scavenger receptors and beta-glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 61, 113-26.
140. Mollnes, T. E., Brekke, O. L., Fung, M., Fure, H., Christiansen, D., Bergseth, G., Videm, V., Lappégard, K. T., Kohl, J., Lambris, J. D. (2002) Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* 100, 1869-77.
141. Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J. S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz, P. D., Jr., Ariizumi, K. (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *The Journal of biological chemistry* 281, 38854-66.
142. Heit, B., Kim, H., Cosio, G., Castano, D., Collins, R., Lowell, C. A., Kain, K. C., Trimble, W. S., Grinstein, S. (2013) Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization. *Developmental cell* 24, 372-83.
143. Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., Henson, P. M. (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *The Journal of cell biology* 155, 649-59.
144. Winnicka, B., O'Connor, C., Schacke, W., Vernier, K., Grant, C. L., Fenteany, F. H., Pereira, F. E., Liang, B., Kaur, A., Zhao, R., Montrose, D. C., Rosenberg, D. W., Aguila, H. L., Shapiro, L. H. (2010) CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *Journal of leukocyte biology* 88, 347-59.

145. May, R. C. and Machesky, L. M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* 114, 1061-77.
146. Hallal-Calleros, C., Agramonte-Hevia, J., Garay-Canales, C., Oliver, J. M., Guerra-Araiza, C., Heras, D., Camacho-Arroyo, I., Soto-Cruz, I., Ortega, E. (2005) Syk and Lyn phosphorylation induced by FcγRI and FcγRII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells. *Immunology letters* 99, 169-79.
147. Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Look, A. 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, 3344-9.
148. Ashmun, R. A. and Look, A. T. (1990) Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood* 75, 462-9.
149. Sendide, K., Reiner, N. E., Lee, J. S., Bourgoin, S., Talal, A., Hmama, Z. (2005) Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. *J Immunol* 174, 4210-9.
150. Harokopakis, E. and Hajishengallis, G. (2005) Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *European journal of immunology* 35, 1201-10.
151. Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., Laudanna, C. (2000) Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759-69.
152. Wentworth, D. E., Tresnan, D. B., Turner, B. C., Lerman, I. R., Bullis, B., Hemmila, E. M., Levis, R., Shapiro, L. H., Holmes, K. V. (2005) Cells of human aminopeptidase N (CD13) transgenic mice are infected by human coronavirus-229E in vitro, but not in vivo. *Virology* 335, 185-97.
153. Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjostrom, H., Noren, 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. *Journal of virology* 68, 5216-24.

154. Corti, A., Curnis, F., Arap, W., Pasqualini, R. (2008) The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood* 112, 2628-35.
155. Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., Ruoslahti, E. (2000) Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer research* 60, 722-7.
156. Garde, S. V., Forte, A. J., Ge, M., Lepekhn, E. A., Panchal, C. J., Rabbani, S. A., Wu, J. J. (2007) Binding and internalization of NGR-peptide-targeted liposomal doxorubicin (TVT-DOX) in CD13-expressing cells and its antitumor effects. *Anti-cancer drugs* 18, 1189-200.
157. Kovak, M. R., Saraswati, S., Schoen, D. J., Diekman, A. B. (2014) Investigation of Galectin-3 Function in the Reproductive Tract by Identification of Binding Ligands in Human Seminal Plasma. *Am J Reprod Immunol*.
158. Mina-Osorio, P., Soto-Cruz, I., Ortega, E. (2007) A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 353, 605-10.
159. Sato, S. and Hughes, R. C. (1994) Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *The Journal of biological chemistry* 269, 4424-30.
160. Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. I., Kuwabara, I., Chi, E. Y., Henderson, W. R., Jr. (1995) Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *The American journal of pathology* 147, 1016-28.
161. Sato, S., Ouellet, N., Pelletier, I., Simard, M., Rancourt, A., Bergeron, M. G. (2002) Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol* 168, 1813-22.
162. Farnworth, S. L., Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Atkinson, K. M., Wilkinson, T., Dhaliwal, K., Hayashi, K., Simpson, A. J., Rossi, A. G., Haslett, C., Sethi, T. (2008) Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *The American journal of pathology* 172, 395-405.

163. Vray, B., Camby, I., Vercruyse, V., Mijatovic, T., Bovin, N. V., Ricciardi-Castagnoli, P., Kaltner, H., Salmon, I., Gabius, H. J., Kiss, R. (2004) Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 14, 647-57.
164. Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K., Raz, A. (1996) Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer research* 56, 4530-4.
165. Kuwabara, I. and Liu, F. T. (1996) Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 156, 3939-44.
166. Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., Liu, F. T. (2000) Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 165, 2156-64.
167. Karlsson, A., Follin, P., Leffler, H., Dahlgren, C. (1998) Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 91, 3430-8.
168. Forsman, H., Salomonsson, E., Onnheim, K., Karlsson, J., Bjorstad, A., Leffler, H., Bylund, J., Karlsson, A., Dahlgren, C. (2008) The beta-galactoside binding immunomodulatory lectin galectin-3 reverses the desensitized state induced in neutrophils by the chemotactic peptide f-Met-Leu-Phe: role of reactive oxygen species generated by the NADPH-oxidase and inactivation of the agonist. *Glycobiology* 18, 905-12.
169. Karlsson, A., Christenson, K., Matlak, M., Bjorstad, A., Brown, K. L., Telemo, E., Salomonsson, E., Leffler, H., Bylund, J. (2009) Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 19, 16-20.
170. van den Berg, T. K., Honing, H., Franke, N., van Remoortere, A., Schiphorst, W. E., Liu, F. T., Deelder, A. M., Cummings, R. D., Hokke, C. H., van Die, I. (2004) LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol* 173, 1902-7.

171. Gupta, S. K., Masinick, S., Garrett, M., Hazlett, L. D. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. *Infection and immunity* 65, 2747-53.
172. Fowler, M., Thomas, R. J., Atherton, J., Roberts, I. S., High, N. J. (2006) Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cellular microbiology* 8, 44-54.
173. Mey, A., Leffler, H., Hmama, Z., Normier, G., Revillard, J. P. (1996) The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol* 156, 1572-7.
174. Barboni, E., Coade, S., Fiori, A. (2005) The binding of mycolic acids to galectin-3: a novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids? *FEBS letters* 579, 6749-55.
175. Pelletier, I. and Sato, S. (2002) Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *The Journal of biological chemistry* 277, 17663-70.
176. Moody, T. N., Ochieng, J., Villalta, F. (2000) Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS letters* 470, 305-8.
177. Fradin, C., Poulain, D., Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infection and immunity* 68, 4391-8.
178. Kohatsu, L., Hsu, D. K., Jegalian, A. G., Liu, F. T., Baum, L. G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 177, 4718-26.
179. Sato, S. and Nieminen, J. (2004) Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconjugate journal* 19, 583-91.
180. Allen, L. A. and Aderem, A. (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *The Journal of experimental medicine* 184, 627-37.

181. Morel, F., Doussiere, J., Vignais, P. V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *European journal of biochemistry / FEBS* 201, 523-46.