

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“FUNCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE SLAMF7 (CRACC) EN CÉLULAS
CITOTÓXICAS HUMANAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

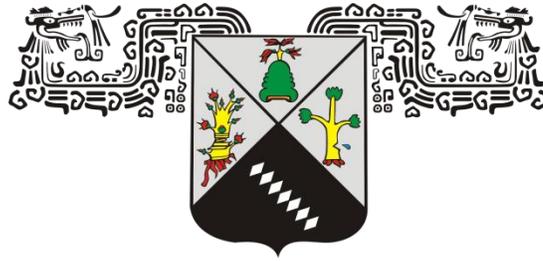
PRESENTA

ARTURO GUTIÉRREZ GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“FUNCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE SLAMF7 (CRACC) EN CÉLULAS
CITOTÓXICAS HUMANAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ARTURO GUTIÉRREZ GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **FUNCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE SLAMF7 (CRACC) EN CÉLULAS CITOTÓXICAS HUMANAS**, que presenta el alumno **Arturo Gutiérrez Guerrero (10010091)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Claudia González Espinosa CINVESTAV	APROBADO	
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. José Luis Montiel Hernández FF-UAEM	APROBADO	
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-05-03 17:51:15 | Firmante

vc7TK1oMOadzO8+uCWFDLU3E7k54ISOiySZ3isH3YOhOKLexlZwNjn01gsu4OFVnwhfK/OKuBoGWSk2K15iLm9fVNVGRR5t9nvMv7/wj+MPIWAYVml/MhM79nW87d5eU5DpSj5t4q5KhUlkZ1cQNLeYnv2eBd2zGlaBbHD/XTew9Jp+ulvLXbUWom9Dst5YYIoEBavFSN/b3DDdQSRZxed/GQAxE12IVzSpokocJmOqh2Luj1Y9lJ5ftf+OjtMfFaceGwMK0j2NBVyt+kLiLCy+2R+CDGyl/CMFO8sQu6ODfPzOlplNgb0cn4Pc8nO9Q/SiglzDKMPu3LlJZSuA==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2022-05-03 17:58:23 | Firmante

Yh3wtXGBa9hBWrwGZUw/RjwiUF119+2+oz0uMv7VnNqsS5ghIG69fSKDd55zBgmnlC9CNp+ta4Z+AHVaxsM9C6wApPgiLoCrQvnS3Jxapn1z4h2z+j4fq1MKb3pZdxzfyuoJSPPRD8LzsqFgAYVvli5LmTLgwtXAEjDKh1I5odmFtJQ3auN3HR96UF3qRp9V4sflzdrahe5mR1Mj3IkPP61F2W6841jXD6H25ff/maf06a0S0JIT83ETnJZPs9fLaQ1oc4bB/NTRP91C1o9OKNJ8trA6UmTElhJhBoN336Mqj3eU9O41CoF7uQdJogemYp6E5AfzX35VMrecXMoDyw==

CLAUDIA GONZALEZ ESPINOSA | Fecha:2022-05-03 17:58:26 | Firmante

NhvW7ZB4FZ64Tfr25Cyls5T38LvrzmX3WgcleuXG3U40GAe0t3wwwOSId+8IBwjrpdch51G0Fa/IAeouJsBokyaDLvHN9Ov+/Ow6pongrrHbsV0sQIXPEEafvdJHGq+sHeDARQn1+xHdpSu68aCdEpxezaxj/3nGoGXh3b3mDSVcv+Mtsw2JAxNSH7fnrY4SAN83HX53MYO2IA/BmX0zQkVP2TU2pKgaXnDLaz1TJJGb3xtO97x1AVG3xeTG7vdjfl7HmKf6274mN46x44+5w0Zx5Rq88QO78iAFN9rsGsGOEsqrHqxo1GXZ4w2jdp16dxeFlxQungZH9JQGnkBgw==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-05-03 18:57:44 | Firmante

nx5XjWm2edvcEzK+uxSE1tTPxHfv6hRdlRi0K46i3iQnAXkDZEg3GgWL/ZU7cevf5nmuCvscB+DrS+QenWlmsLyp+y1Dc/u14poU2G1idEFSFrPS+TXJ9IMuDKyLyAWS5dlyoCNkBCXVwNggKilyNDBpfYw+icB62kPrUXbOR21xWQX5+jf9q1XyUUpiqGahYV5mNPNfxlnWwUpHCg/CPC6UKyUfCfYMobz47zprpY87vki/bjQUKeoZT8Em5QpWg0ni2eG1gBBzjfKeeidEk+ErH2O7TiHdW09EAekVdglE5IBYK+gjeqSee891Oi+tStaf3UL4Yr6aj3xX6Wg==

YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY | Fecha:2022-05-03 21:50:24 | Firmante

rC6WwSluWwBxpUCgubluxqjZr5oIU+G4M5mrwRa4t2Umm+UE/ix1YZmyhUJ5Gr5knUPuku9CAO5WU3RmOYxU52hRzxYBmbOzhN8/vi/61lrWfRotfgZrxJm93+g90QXPuO N14lcbGnIX1rt+pMBluqK6L5Wz/EydboWVtRSkGRbJZLAZXzQEzLUbftS N1EmV28DitfEnfTgmXj3qScygdX7fb4sAQ6KuxZF9oJpmn1CYvAqLX5hTawy9uY/A8Atm2J1rBd8x68Xvaq0jsGob4y9RtmiHPESurmpxRgBpJSlpmN3wndAfwwa+Hw/kB2CLulpnQHuxNpayLisWQ==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-05-03 23:31:47 | Firmante

EAvGd5id4Dt8BV98re+MUKb+6utKxJB0j+ddm3TZN5Z56Q1OvQ3xikbMvYjEYyX1r2om0Y/jed06H1KoygTx2AuV9B1BUPCwYlD31ygseYoMtBoHfDcNhmQGwq7L6eq8nF2F1rqtV9zMPbQzERC2NWD3rA0VAyn8lExMvRHkWPv17zTjz7FcNo8U7fQrN6k/vQJnSf3R5KBO9RqLPeBmsqHoS+WAEsI6qx54ee2QAdFvATv9FrXa81mVpWOn5qTZcdBAVvJSMv0cPi9t4inQSD6E0B4Ks13wm7wsd1YHuyBWXKTH1PiLXGWPX/OM1QllfXsIRKSwLCRf13dzHg==

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2022-05-04 11:35:03 | Firmante

Zxk/KcCv1EKd55t1aBr2MyxfQDaSG58bX5+3euHzC+AgamjMek+PLga5G0dGAJfJlsBVIJtxre3KCMkcoDIT/5YfFB/6dq/Pc4OGC75WHJMfgHAVsHQ5NPE6QemQQKXnnvW2Gx6K00Dggr0PZ05f8+gre5505d7KeQwsFA2MX1O1UAtizX/PErLzShlwq+ii0dFiliAHjzYtUE3NiUV50KLD6brMbifc1c/JKIwKMGkMvrtbP2M+bzwll/xWYp6U8/yIvxtHqXSWFpPqUbnmB6M8U6XSvKMrEFJFMN0hosJ3SyYwrReUuSt8cl5NHt5L9rWcPv8TMikFI0WpkkBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Ymqb1BjgA

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a5w5hwnJzyU4SZZWwGSPINTxOMul9ot09>



Publicaciones relacionadas

- I. Bouchon, M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna, “Cutting Edge: Activation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by a SAP-Independent Receptor of the CD2 Family,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 10, pp. 5517–5521, 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5517.
- II. J. K. Lee, K. S. Boles, and P. A. Mathew, “Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 10, pp. 2791–2799, 2004, doi: 10.1002/eji.200424917.
- III. I. Tassi and M. Colonna, “The Cytotoxicity Receptor CRACC (CS-1) Recruits EAT-2 and Activates the PI3K and Phospholipase C γ Signaling Pathways in Human NK Cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 12, pp. 7996–8002, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.12.7996.
- IV. S. Stark and C. Watzl, “2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells,” *Int. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 241–247, 2006, doi: 10.1093/intimm/dxh358.
- V. M. E. Cruz-Munoz, Z. Dong, X. Shi, S. Zhang, and A. Veillette, “Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 297–305, 2009, doi: 10.1038/ni.1693.
- VI. L. A. Pérez-Quintero, R. Roncagalli, H. Guo, S. Latour, D. Davidson, and A. Veillette, “EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase C γ , Ca $^{++}$, and Erk, leading to granule polarization,” *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 4, pp. 727–742, 2014, doi: 10.1084/jem.20132038.
- VII. J. Chen *et al.*, “SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin,” *Nature*, vol. 544, no. 7651, pp. 493–497, 2017, doi: 10.1038/nature22076.
- VIII. H. Guo, M.-E. Cruz-Munoz, N. Wu, M. Robbins, and A. Veillette, “Immune Cell Inhibition by SLAMF7 Is Mediated by a Mechanism Requiring Src Kinases, CD45, and SHIP-1 That Is Defective in Multiple Myeloma Cells,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 1, pp. 41–51, Jan. 2015, doi: 10.1128/mcb.01107-14.
- IX. D. Comte, M. P. Karampetsou, N. Yoshida, K. Kis-Toth, V. C. Kyttaris, and G. C. Tsokos, “Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8 $^{+}$ T Cell Function in Systemic Lupus Erythematosus,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 69, no. 5, pp. 1035–1044, May 2017, doi: 10.1002/art.40038.

Créditos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y fue realizado bajo la tutoría del Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, jefe del mismo laboratorio.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se contó con el apoyo económico de una beca para doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Beca número: 575482.

Los resultados obtenidos de este trabajo fueron presentados en congresos nacionales e internacionales y se contó con apoyo del laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Agradecimientos

Al Dr. Mario Cruz por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado en el laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Medicina, UAEM. Gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por sus críticas y por el tiempo que compartimos realizando experimentos en el laboratorio, sin duda, fueron grandes momentos.

Al laboratorio de la Dra. Ivonne Rosenstein, en especial a Erika, por siempre apoyarnos con el citómetro y por siempre estar con la mejor disponibilidad para que lo pudiéramos utilizar.

Al laboratorio de la Dra. Angelica Santana, en especial a Linda, por apoyarnos con el citómetro para poder terminar los últimos experimentos del artículo.

Al Dr. José Luis Montiel, por el apoyo y los buenos consejos para la redacción de la tesis. Aprendí mucho de sus observaciones, gracias doctor.

A mis compañeros del laboratorio con quien tuve la oportunidad de compartir grandes momentos; Den, Juan, Jonathan, Mitzy, Karina, Jacky, Daniela y en especial a Lucero y María Elena (Mali), por el gran apoyo y los consejos para la adquisición de muestras en el citómetro. A Mali, por acompañarme tantas veces para la adquisición de mis muestras de citometría y microscopía confocal, gracias.

Al Dr. José Luis Maravillas, por sus buenos consejos para analizar los datos de microscopía confocal, gracias Dr.

Al Dr. Santa-Olalla por siempre apoyarnos con la mejor disponibilidad en cuanto a equipos e insumos. Al Dr. Chimal por siempre apoyarnos con los Buffy Coats, y aunque ya no están entre nosotros, siempre serán recordados con un gran afecto.

A mi familia, mi esposa Ana Victoria y mi hija Dariana Valentina, por siempre estar presentes y por tanto apoyo, sin su compañía, todo esto hubiera sido menos enriquecedor. A mis padres, hermanos y hermanas, esto también es para ustedes.

Dedicatoria

Para mi esposa Ana Victoria, para mi hija Dariana Valentina, para mis padres Noe y Delia, y para todas mis hermanas y hermanos. Por siempre estar ahí, esto es para todos ustedes.

Siglas y abreviaturas

Las siguientes siglas y abreviaturas proceden del idioma inglés

AKT	Protein kinase B; PKB
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BCR	B cell receptor
BID	BH3-interacting domain death agonist
CAR	Chimeric antigen receptor
CMV	Cytomegalovirus
CRACC	CD2-like receptor activating cytotoxic cells
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic cells
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAT-2	Ewing's sarcoma-associated transcript 2
EBV	Epstein-Barr virus
EndoG	Endonuclease G
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FasL	Fas Ligand
GFP	Green fluorescent protein
HLA	Human leukocyte antigen
HLH	Hemophagocytic lymphohistiocytosis
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
ILT	immunoglobulin-like transcripts
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors

LAK	lymphokine-activated killer
LILR	Leukocyte immunoglobulin-like receptors
MHC	Major histocompatibility complex
MFI	Mean fluorescence intensity
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NK	Natural Killer
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PHA	Phytohemagglutinin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PLC-γ	Phospholipase C-gamma
PMA	Phorbol 13-acetate 12-myristate
RAG	Recombination activating gene
SAP	SLAM-associated protein
SH2	Src homology 2
SH2D1A	SH2 Domain-Containing Protein 1A
SIRP-α	Signal-regulatory protein alpha
SLAM	Signaling lymphocytic activation molecule
SLAMF7	SLAM family member 7
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC	Supramolecular activation complex
Syk	Spleen tyrosine kinase
TCR	T-cell receptor
TIGIT	T-cell immunoglobulin and ITIM domain
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR	TRAIL-receptor
XLP1	X-Linked Lymphoproliferative Disease Type 1
ZAP70	Zeta-chain associated protein kinase 70 kDa

Resumen

Las células Natural Killer (NK) juegan un papel esencial en la inmunidad contra tumores e infecciones virales a través de dos mecanismos fundamentales: secreción de citocinas y función citotóxica. Por lo tanto, una mejor caracterización de los mecanismos moleculares y celulares que regulan estos procesos es de gran importancia para evaluar la modulación de sus funciones efectoras en el ámbito clínico. Por su parte, la familia de proteínas SLAM es un grupo de receptores transmembranales que se expresan de forma diferencial en las células hematopoyéticas. Las células NK expresan varios miembros de la familia SLAM, dentro de los cuales, los receptores 2B4 y SLAMF7 son los mejor estudiados. En el modelo murino, la expresión del ligando de SLAMF7 en la célula diana, estimula la función citotóxica de las células NK a través de un mecanismo dependiente de la proteína adaptadora EAT-2, sin embargo, se desconoce si la función y modos de acción de SLAMF7 están conservados en células NK humanas. Estudios previos en células NK de origen humano mostraron que el entrecruzamiento de SLAMF7 en la superficie de las células NK, mediante el empleo de anticuerpos específicos, estimula la función citotóxica de las células NK. Así mismo, se observó que la expresión de SLAMF7 en células tumorales que carecen de moléculas del MHC-I son eliminadas más eficientemente por células NK en comparación de su contraparte, que no expresa SLAMF7. Estos resultados sugieren que SLAMF7 es un receptor que promueve la activación de células NK, sin embargo, no son claros los mecanismos subyacentes. Es por eso que en este trabajo nos enfocamos en evaluar el patrón de expresión de SLAMF7 en diferentes subpoblaciones y estadios de activación de células NK humanas, así como determinar su participación en eventos tales como citotoxicidad, adhesión, polarización y degranulación celular. Finalmente, con el objetivo de iniciar la caracterización de los mecanismos intracelulares en células NK humanas, evaluamos la dependencia de las funciones mediadas por SLAMF7 por algunas proteínas de señalización. Para lograr estos objetivos, se expresó ectópicamente SLAMF7 en células HeLa, las cuales sirvieron como un modelo de células que son susceptibles a la función lítica de las células NK. Se realizaron varios ensayos funcionales basados en el uso de citometría de flujo y microscopía confocal. Nuestros resultados mostraron que la expresión basal de SLAMF7 está regulada en función del estadio de activación de las células NK. Además, se observó que la presencia del ligando natural de SLAMF7 en células HeLa favorece su lisis con respecto a células que no expresan

SLAMF7, este incremento en la función citotóxica promovida por SLAMF7 correspondió con una mayor degranulación, la cual fue dependiente de la participación de PLC- γ , y en un menor impacto, de PI3K. En contraste a la degranulación, como principal mecanismo que favorece la función lítica de las células NK, SLAMF7 no tuvo un impacto significativo en la adhesión o en la polarización celular. En conclusión, este trabajo demuestra que en células NK humanas, SLAMF7 promueve señales de activación que inciden principalmente en influenciar la degranulación celular a través de un mecanismo dependiente de PLC- γ y, consecuentemente, contribuye a regular eventos efectoros específicos durante la respuesta citotóxica de las células NK.

Abstract

NK cells play an essential role during the antitumoral and antiviral response through two main mechanisms: secretion of cytokines and release of granzyme and perforin (cytotoxic function). Therefore, understanding the cellular and molecular mechanisms that govern the effector functions of NK cells is very important to know how these cells fight off different target cells. The cytotoxic function of NK cells is regulated by several surface activating and inhibitory receptors, but the exact function of some of these receptors during the elimination of target cells is yet to be determined. SLAM receptors are in the group of transmembrane proteins exclusively expressed by hematopoietic cells. 2B4 and SLAMF7 are two of the SLAM receptors best studied in NK cells. In that sense, it has been demonstrated that the ligand expression of SLAMF7 in target cells increase the cytotoxic function of mouse NK cells and this effect is dependent of the presence of the adaptor protein EAT-2. Many studies suggest that this receptor regulates the cytotoxic function in human NK cells. On one hand, the cross-linking of SLAMF7 using specific monoclonal antibody triggers the cytotoxic function of NK cells. On the other hand, the expression of SLAMF7 on target cells lacking MHC-I molecules are killed more efficiently by NK cells. These results suggest that SLAMF7 plays an important role during the activation of NK cells, however, the mechanisms that lead to those functions are unknown. In this work we were focused on evaluate the expression of SLAMF7 in different activations states of in human NK cells. We also evaluated the impact of SLAMF7 in cell adhesion, cell polarization and cell degranulation during the engagement of SLAMF7 in human NK cells. Finally, we also evaluated the participation of PLC- γ and PI3K during the engagement of SLAMF7 in human NK cells. We used a target cells expressing the SLAMF7 ligand and through several functional assays based on the use of flow cytometry and confocal microscopy, we evaluated the impact of SLAMF7 in human NK cells. We found that NK cells express SLAMF7 basally, but their activation in vitro significantly increased the expression of SLAMF7. Likewise, we demonstrated that physiological ligand of SLAMF7, expressed by target cells, increase the cytotoxic function of human NK cells. This result was primarily determined on the ability of SLAMF7 to promote NK cell degranulation rather than cell adhesion or granule polarization. Additionally, this outcome was dependent on PLC- γ , and with less impact on PI3K. In conclusion, we generated convincing evidence that SLAMF7 regulate discrete cellular events

(cell degranulation) rather than global cellular process during the activation of human NK cells.

Contenido

Publicaciones relacionadas	II
Créditos	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	V
Siglas y abreviaturas	VI
Resumen	VIII
Abstract	X
INTRODUCCIÓN	1
Células Natural Killer	1
Desarrollo y origen de las células NK	1
Población de células NK humanas	2
Eliminación de células blanco por linfocitos citotóxicos	4
Educación de las células NK	9
Receptores de inhibición, receptores de activación y respuesta efectora de las células NK	11
Motivos de señalización involucrados durante la activación de las células NK	16
Principales proteínas de señalización involucradas en la activación de las células NK	17
Principales receptores de activación en células NK	18
Los receptores SLAM se expresan de manera diferencial sobre células inmunes	22
.....	27
SLAMF7 presenta dos tirosinas potencialmente fosforilables	27
EAT-2 recluta a PLC- γ en células NK	28
SLAMF7 en otras células inmunes	29
Justificación	31
Hipótesis	33
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
Materiales y métodos	35
Anticuerpos y citometría de flujo	35
Cultivo de las líneas celulares y células primarias purificadas a partir de sangre periférica	35
Infección retroviral	36
Ensayo de lisis y degranulación celular específica	37
Evaluación de citocinas intracelulares	38

Microscopía confocal	39
Formación de conjugados celulares.....	40
Estadística de los resultados obtenidos	40
RESULTADOS	41
La expresión de SLAMF7 se favorece en células NK activadas	41
La expresión de SLAMF7 en células blanco incrementa la capacidad citotóxica de las células NK	45
SLAMF7 no afecta la formación de conjugados celulares entre las células NK y las células blanco	51
SLAMF7 no afecta de manera significativa el evento de polarización en las células NK	53
SLAMF7 incrementa de manera significativa la degranulación celular en las células NK humanas	55
SLAMF7 promueve la activación de las células NK a través de una vía que depende principalmente de PLC- γ	57
Discusión	61
Resumen Gráfico.....	70
Perspectivas	71
Referencias.....	72
Anexo A	81
Artículo de investigación	81

INTRODUCCIÓN

Las células NK y las células T CD8⁺ son las células citotóxicas mejor estudiadas del sistema inmune, ambas se concentran en combatir infecciones virales y/o tumorales [1]. Por un lado, se sabe que las células NK expresan una gran diversidad de receptores transmembranales, los cuales pueden ser o activadores o inhibidores, en consecuencia, el balance de señales entre estos receptores determina si se promueve, o no, la capacidad citotóxica de las células NK. Por otro lado, aunque las células T CD8⁺ también expresan una gran diversidad de receptores transmembranales, se reconoce que su activación depende casi por completo del TCR. En ese contexto, una vez que las células citotóxicas reconocen a su célula blanco, estas se activan y son capaces de promover la eliminación directa de células diana [2], [3].

Actualmente se tiene una comprensión más clara acerca de los mecanismos moleculares y celulares que regulan la función efectora de las células citotóxicas, sin embargo, también es cierto que aún existen interrogantes importantes respecto a la función que desempeñan receptores poco explorados en estas células, ejemplo de lo anterior corresponde al receptor SLAMF7, un receptor que incrementa la capacidad citotóxica de las células NK murinas y, al parecer, también regula el estado funcional de las células NK humanas. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue elucidar el impacto de SLAMF7 durante la activación de las células NK humanas.

Células Natural Killer

Desarrollo y origen de las células NK

Las células NK (del inglés, natural killer) son células linfoides que se originan en médula ósea a partir de un progenitor linfóide común. Recientemente se ha sugerido que el desarrollo y maduración de las células NK puede llevarse a cabo no solamente en médula ósea, sino también en otros tejidos, principalmente en los tejidos linfoides secundarios [4]. En este sentido se ha sugerido que los diferentes microambientes en los cuales se desarrollan las células NK pueden impactar sobre su fenotipo y en consecuencia, pueden contribuir en la diversidad de las mismas, incluso en un mismo individuo [5]. Otro punto importante durante el desarrollo de las células NK, es que la interacción directa entre células dendríticas (DC,

por sus siglas en ingles) y las células NK resulta ser crucial para la generación de células NK inmunocompetentes con una alta capacidad citotóxica [6], [7].

A principios de los setenta, las células NK comenzaron a describirse como linfocitos granulares capaces de eliminar células tumorales a través de un mecanismo de citotoxicidad natural. Esta capacidad no necesitaba de un reconocimiento previo con el antígeno [8], [9]. Con el paso de los años, diversas investigaciones permitieron agruparlas dentro del linaje linfoide, y fueron reconocidas, no solamente como células con potentes efectos citotóxicos, sino también, como células efectoras productoras de citocinas y quimiocinas. Actualmente sabemos que las células NK no solamente eliminan células tumorales o transformadas, sino que además participan en la defensa en contra de infecciones microbianas intracelulares, principalmente infecciones virales. De igual forma, como resultado de la capacidad que tienen para secretar citocinas, las células NK regulan indirectamente la activación de otras células inmunes. En consecuencia, las células NK pueden considerarse como células polifuncionales [10], [11].

Las células NK están dotadas con una serie de receptores que son codificados por genes de la línea germinal. Cada uno de estos receptores pueden, tanto estimular como inhibir las funciones efectoras de estas células. Debido a que las células NK son capaces de reconocer y eliminar células blanco sin la necesidad de un reconocimiento previo, se consideran células del sistema inmune innato [2], [11]. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las células NK son capaces de desarrollar un tipo de memoria inmunológica a corto plazo durante ciertas infecciones virales, en particular en aquellas causadas por citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés). Este tipo de memoria inmunológica depende de distintos mecanismos epigenéticos [12], [13].

Población de células NK humanas

Las células NK humanas representan del 5 al 20 % de los linfocitos circulantes totales. En humanos, se caracterizan por expresar la molécula CD56, pero no CD3, por lo tanto, se definen como CD56⁺CD3⁻. En base a la expresión de CD56, las células NK pueden subdividirse en dos poblaciones principales, células NK CD56^{dim} y células NK CD56^{bright}, y cada una de estas lleva a cabo funciones efectoras particulares [5], [14], **Figura 1**. Aproximadamente un 10% de las células NK totales que encontramos en circulación exhiben

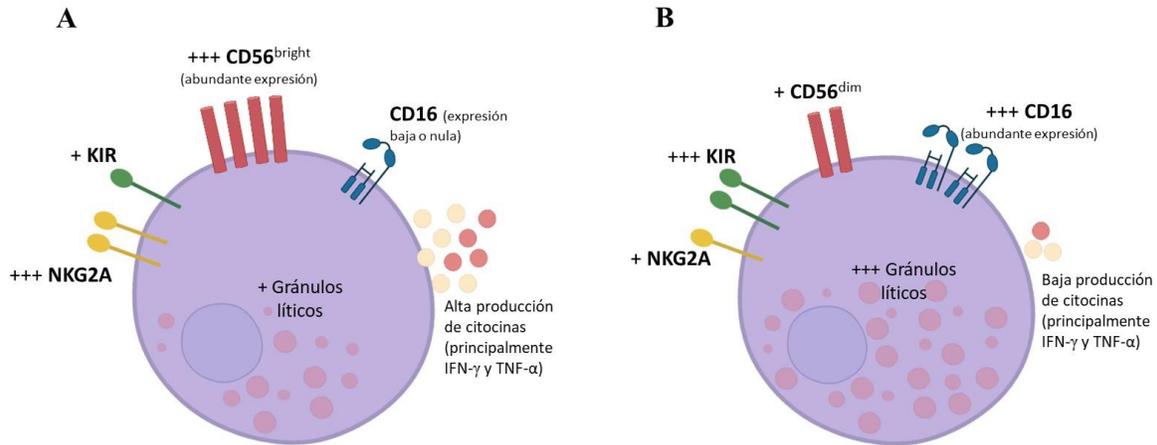


Figura 1. Células NK humanas. En base a la densidad de la molécula CD56, las células NK humanas se clasifican en CD56^{bright} o CD56^{dim} y cada una de estas subpoblaciones se encuentran cumpliendo funciones específicas. Las células NK CD56^{bright} principalmente se caracterizan por secretar citocinas y comprenden alrededor del 10% del total de las células NK que se encuentran en circulación sanguínea, el otro 90% de células NK, corresponde a las células NK CD56^{dim} las cuales se caracterizan por presentar potentes efectos citotóxicos. Receptor de la familia de las inmunoglobulinas (KIR), receptores de células NK (NKR).

una expresión abundante de la molécula CD56, subpoblación que se le conoce como CD56^{bright}, la cual se caracteriza por secretar grandes cantidades de citocinas, principalmente interferón gamma (IFN-γ, por sus siglas en inglés) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α, por sus siglas en inglés). Interesantemente, la mayoría de las células NK que se alojan en tejido presentan el fenotipo CD56^{bright} [15], las cuales exhiben una abundante expresión de receptores para quimiocinas, lo que les permite desplazarse fácilmente de un sitio a otro. Así mismo, también hay evidencia que sugiere que las células CD56^{bright} podrían ser los intermediarios para el desarrollo de las células CD56^{dim}, se denominan CD56^{dim} ya que con respecto a las células NK CD56^{bright}, expresan una densidad menor de la molécula CD56 [16], [17]. Ésta última, es la subpoblación mayoritaria que se encuentra en circulación, ya que comprenden alrededor del 90% de las células NK totales, **Figura 1.** La población CD56^{dim} no solamente es la más abundante en circulación, sino que también se caracteriza por ser altamente citotóxica, pues expresa grandes cantidades de vesículas líticas las cuales contienen proteínas líticas (granzimas y perforina), los cuales son responsables de promover la eliminación/lisis directa de células blanco a través de un mecanismo conocido como citotoxicidad natural [11], [14]. Aunque las células CD56^{bright} se especializan en la secreción de citocinas y exhiben niveles bajos de perforina y granzimas, también pueden ser capaces

de eliminar células blanco a través de los receptores FasL o TRAIL [18], un mecanismo que describimos con más detalle en la siguiente sección.

Notablemente, se ha reportado que la estimulación de células NK CD56^{bright} con interleucina 15 (IL-15) promueve de manera significativa la síntesis de proteínas citolíticas, potenciando de esta manera su capacidad citotóxica hacia ciertas células tumorales. Sin embargo, aún no está del todo claro cuál es la contribución exacta de éstas células durante una respuesta inmune hacia ciertos virus o células tumorales [14]. Por lo tanto, aunque las células NK secretan grandes cantidades de citocinas antivirales o antitumorales y promueven la eliminación de células blanco a través de ligandos de muerte, el papel principal de las células NK es el de eliminar células blanco a través de la liberación de perforina y granzimas, un proceso finamente regulado que se describe a continuación.

Eliminación de células blanco por linfocitos citotóxicos

A diferencia de las células T CD8⁺, que requieren de una activación previa para adquirir la maquinaria citotóxica, las células NK están capacitadas para eliminar células blanco susceptibles en cualquier momento, pues adquieren toda su maquinaria citotóxica durante su desarrollo y maduración [1]. Una vez que las células NK o las CTL encuentran a su célula blanco, se desencadenan una serie de sucesos estrictamente regulados durante el proceso efector de estas células citotóxicas. Estos eventos incluyen la adhesión celular, la convergencia de vesículas líticas, la polarización de estas vesículas líticas, la exocitosis o degranulación de proteínas líticas y finalmente la eliminación de células blanco [19], [20], **Figura 2**. Todos estos pasos aseguran la eliminación eficiente de células blanco, por lo cual, cada uno de ellos son esenciales durante una respuesta citotóxica celular, por otro lado, si alguno de estos eventos llegara a fallar, la capacidad citotóxica se puede ver comprometida, lo que provoca que las células NK o CTL no puedan eliminar adecuadamente a las células blanco [19].

Así mismo, la participación de varias proteínas citoplasmáticas es esencial para asegurar que estas células liberen su contenido citotóxico de manera eficiente y se promueva una adecuada eliminación de las células blanco. Entre las principales proteínas se incluye a los microfilamentos de actina, las dineínas, el centro organizador de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés), además de proteínas involucradas en el transporte y la fusión

vesicular [19], [20]. Uno de los eventos más tempranos que acontece durante la respuesta citotóxica es la reestructuración del citoesqueleto, la cual se caracteriza por la polimerización de los microfilamentos de actina hacia el sitio de contacto entre la célula NK y su célula blanco. Así mismo, la reubicación del MTOC y las vesículas líticas cargadas con perforina y granzimas hacia el sitio de la sinapsis lítica es otro de los procesos característicos durante los primeros minutos de activación de células NK [19]. Sin embargo, antes de que el MTOC sea reubicado en el sitio de sinapsis, ocurre un fenómeno conocido como convergencia de gránulos líticos, un paso esencial que se caracteriza por la migración de las vesículas cargadas de granzimas y perforina hacia el MTOC. Este proceso de convergencia es de suma importancia, pues se ha demostrado que a través de este mecanismo se logra proteger a las células sanas que se encuentran adyacentes a la célula blanco, y por otro lado, se asegura que las proteínas citotóxicas sean liberadas de manera específica solo hacia el sitio de contacto con la célula blanco [21]. Este proceso de convergencia es facilitado por proteínas de transporte citosólico como las dineínas [22]. Únicamente después de que ha ocurrido el proceso de convergencia, todo este complejo macromolecular comienza a migrar y a concentrarse en el punto de sinapsis lítica y este evento se conoce como polarización [19]. Así mismo, la reorganización de los microtúbulos es fundamental, pues es a través de estos que las vesículas líticas son transportadas hacia el MTOC y posteriormente hacia el sitio de sinapsis lítica, seguido de este evento las vesículas líticas que han polarizado se fusionan con la membrana celular externa, permitiéndose la liberación y acumulación de granzima y perforina en el sitio de contacto entre la célula efectora y la célula blanco, **Figura 2**, este es uno de los últimos eventos que ocurre durante la fase efectora de las células NK y al cual se le conoce como degranulación [19].

La perforina liberada en el sitio de sinapsis inmune tiene la capacidad de ensamblarse sobre la membrana de la célula blanco y, en presencia de calcio, se polimeriza formando una especie de poro o canal entre el espacio extracelular y el espacio interno de la célula. De esta manera, permite que las granzimas, principalmente granzima B y granzima A, liberadas por la célula citotóxica pasen a través de la membrana de la célula blanco hacia el citosol [18], [23]. Aunque esta fue la vía que se describió por primera vez (vía clásica) sobre como la granzima llega al citosol de la célula blanco, también se ha demostrado que la granzima B (la granzima con mayor capacidad citolítica) puede ser reconocida por el receptor de manosa-

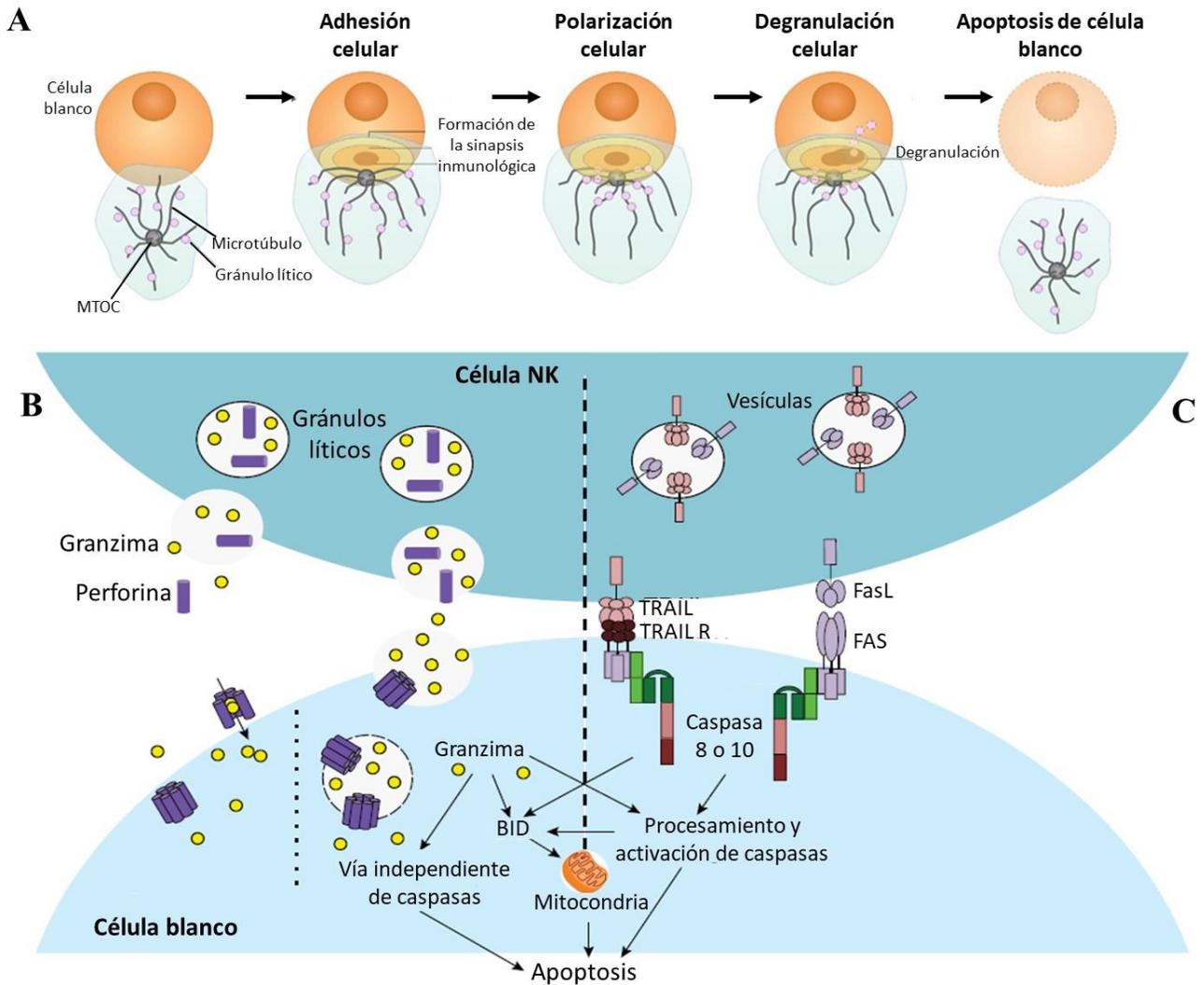


Figura 2. Las células NK eliminan células blanco a través de dos mecanismos principales. Las células citotóxicas eliminan células blanco a través de una serie de eventos que en conjunto garantizan la eliminación eficiente de estas células blanco (**panel superior**). Específicamente, las células NK eliminan células blanco a través de la liberación de perforina y granzimas. La perforina genera poros en la membrana de la célula blanco y esto permite que la granzima alcance el citoplasma donde activan diferentes vías las cuales culminan, o no, en la activación de caspasas (**panel inferior A**). El segundo mecanismo es a través de una citotoxicidad mediada por receptores de muerte, en células NK activadas se induce la expresión de FasL y TRAIL y una vez que se unen a sus respectivos receptores sobre la célula blanco, promueven la activación de caspasa 8 o 10 y estas últimas favorecen la activación de otras caspasas o miembros de la familia BCL-2 como BID (**panel inferior B**). Ambos mecanismos efectores de las células NK conducen a la activación de nucleasas capaces de generar cortes en el DNA, y este daño finalmente conduce a un proceso de muerte denominado apoptosis celular, el cual puede ser dependiente o independiente de caspasas. Centro organizador de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés), linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), complejo supramolecular de activación (SMAC, por sus siglas en inglés). Modificado de, *Kabanova et al., 2018* y *de Prager I, J Leukoc Biol, 2019*.

6-fosfato, un receptor presente en las células blanco. Consecuentemente, la granzima B es

internalizada por endocitosis a través de este receptor y almacenada en vesículas citoplasmáticas dentro de la célula blanco. Sin embargo, aunque la ruta de acceso de la granzima B hacia la células blanco sea a través de un receptor, necesariamente se requiere la presencia de perforina y la formación de poros sobre las diferentes membranas para la liberación de la granzima hacia el citosol de la célula diana. En ausencia de perforina, la capacidad lítica de las células NK o CTL disminuye de manera importante y se encuentra comprometida, consecuentemente, las células citotóxicas son incapaces de eliminar células blanco a través de granzimas [23]. Por lo anterior, la perforina es fundamental para que la granzima logre alcanzar el citosol de la célula blanco y sea capaz de llevar a cabo su función enzimática.

La familia de granzimas son un grupo de proteasas de serina que promueven la activación de otras proteínas a través de generar cortes específicos después de un residuo de aspartato en diferentes pro-caspasas (proteínas en estado inactivo), las cuales son encargadas de promover la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) [24]. Por lo tanto, el procesamiento proteolítico promueve la activación de estas caspasas, lo que conduce a la fragmentación del DNA y apoptosis de la célula blanco [23].

La granzima mejor estudiada en células citotóxicas es la granzima B, que reconoce directamente como sustrato a pro-caspasa 8, pro-caspasa 3 y proteínas de la familia BCL-2 (del inglés, B-cell lymphoma-2), principalmente a BID (del inglés, BH3-interacting domain death agonist) [23]. La caspasa 8 presenta una función iniciadora, pues por sí sola no parece ser capaz de inducir muerte celular. Debido a ello, tiene que activar a otras pro-caspasas para poder desencadenar un proceso apoptótico. La caspasa 8 reconoce como sustrato a pro-caspasa 3 y promueve su activación, esta última una vez activa, tiene la capacidad de activar nucleasas que migran a núcleo y promueven la fragmentación del DNA [25]. Por su parte, las proteínas de la familia BCL-2 regulan de manera importante el ciclo celular y son capaces de inhibir o promover muerte celular a través del procesamiento proteolítico y activación de BID. BID es una proteína que promueve la liberación de citocromo C desde las membranas mitocondriales hacia el citosol. El citocromo C en conjunto con un factor apoptótico, APAF1, activa a la caspasa 9, y al igual que caspasa 8, promueven la activación de caspasa 3 [23], [25]. Por otro lado, BID también participa en la liberación y activación de nucleasas como

EndoG, las cuales son capaces de generar la fragmentación del DNA genómico [23], **Figura 2**. Como consecuencia de esta perturbación en la integridad del DNA, se genera una cascada de señales que conduce a la muerte celular, un proceso que se conoce como apoptosis dependiente de caspasas [18].

Como mencionamos anteriormente, existen otros mecanismos a través de los cuales las células citotóxicas también promueven la eliminación de células infectadas o transformadas. Estos consisten en promover la activación de receptores de superficie celular cuya expresión se induce en muchas células blanco de origen tumoral. La proteína Fas (también conocido como CD95) y TRAILR (del inglés, TRAIL-receptor) forman parte de este grupo de receptores [18], los cuales reconocen al ligando Fas (FasL) o TRAIL, respectivamente. Estas últimas dos, son proteínas que se inducen durante el proceso de activación de las células citotóxicas, lo cual asegura que únicamente las células NK activadas o CTL sean capaces de eliminar células blanco a través de esta vía. Durante la activación de Fas o TRAILR, se genera el reclutamiento de unas proteínas adaptadoras citosólicas con dominios de muerte, las cuales son capaces de reclutar a pro-caspasa 8 y 10. Una vez reclutadas, estas pro-caspasas son procesadas proteolíticamente lo que permite su activación [18]. Como se mencionó anteriormente, caspasa 8 activa a pro-caspasa 3 y esta última, conduce a la activación de enzimas con actividad DNasa (fragmentación del DNA) [25]. Finalmente, también se mencionó que los linfocitos citotóxicos tienen un papel importante durante la secreción de citocinas inflamatorias durante procesos infecciosos o patológicos. Principalmente citocinas como IFN- γ y TNF- α son secretadas por estas células, las cuales participan de manera importante en la inmunidad antiviral y antitumoral [26] y en la activación de otras células inmunes. Estas citocinas son capaces de promover la expresión de genes implicados en la presentación de antígeno, lo que asegura el reconocimiento y activación de otras células efectoras. Así mismo, son capaces de inducir arresto celular e incluso promover de manera directa la eliminación de células blanco a través de un mecanismo dependiente de caspasas [26]. Por lo tanto, aunque la eliminación de las células blanco por las células NK sea principalmente a través de perforina y granzimas; la vía de FasL o TRAIL e incluso por la secreción de citocinas, resulta ser esencial sobre todo en aquellas condiciones donde la vía que depende de perforina y granzimas se encuentra alterada [27], [28].

Al igual que cualquier otra célula inmune, las células NK deben tener la capacidad para responder únicamente en situaciones donde exista daño celular o insultos microbianos y en condiciones fisiológicas normales, las células NK deben permanecer sin respuesta, en otras palabras, deben exhibir tolerancia a las moléculas propias de los diferentes tejidos, es a ese proceso que se le conoce como educación o licencia [29]. Así mismo, debido a su respuesta tan rápida y a su potente citotoxicidad, su umbral de activación debe ser finamente regulado, de lo contrario, si estas células llegan a reaccionar de manera inespecífica contra células sanas podrían desencadenar respuestas autoinmunes que en muchos casos serían mortales [29], [30].

Educación de las células NK

Se han propuesto una serie de modelos muy relacionados entre sí y que tratan de explicar el proceso de educación de las células NK. En ese contexto, está el modelo de licencia (del inglés, licensing) y el modelo de equipamiento (del inglés, arming) [31]. Estos modelos proponen que los receptores de inhibición presentes en las células NK, y que además sean capaces de reconocer a moléculas del MHC-I propias sobre las células adyacentes, conducen al desarrollo de células NK maduras potencialmente citotóxicas. En consecuencia, bajo estos escenarios las células NK generan tolerancia a tejido sano propio y reactividad hacia células blanco [31]. Por otro lado, está el modelo de desarme (del inglés, disarming model) el cual sugiere que todas las células NK que se generan son altamente reactivas, pero pierden su capacidad citotóxica al entrar en un estado de anergia como consecuencia de una activación constante generada por los receptores de activación. Sin embargo, la capacidad citotóxica de las células NK puede ser rescatada únicamente si las señales de activación son atenuadas o frenadas por los receptores de inhibición presentes en estas mismas células [32], [33], [34]. Por otro lado, está el modelo del reóstato (del inglés, rheostat model), un modelo muy relacionado a los modelos de licensing y arming, sin embargo, este modelo también postula que la capacidad citotóxica de una célula NK puede ser calibrada en función del número de moléculas del MHC-I que son capaces de reconocer. Por lo tanto, entre mayor es el número de receptores inhibitorios capaces de señalizar, mayor es la educación de las células NK y, en consecuencia, mayor es la tolerancia a moléculas propias y mayor la reactividad hacia células blanco [35], [36]. Finalmente, encontramos el modelo de confinamiento (del inglés, Confining model), el cual, comparte ideas de los tres modelos ya

mencionados anteriormente, pero también sugiere que es necesaria la participación de receptores de adhesión celular, principalmente, aquellos involucrados en la reorganización del citoesqueleto [37], [38]. Por lo tanto, propone que la educación de las células NK se lleva a cabo a través de un proceso dinámico y finamente regulado por receptores de inhibición, por receptores de activación y señales mediadas por moléculas de adhesión (principalmente integrinas). En consecuencia, la integración de las señales emanadas a través de este conjunto de receptores conduce al desarrollo de células NK maduras, con una tolerancia hacia tejido sano, pero potencialmente citotóxicas hacia células blanco [39], [40].

En ese contexto, diferentes trabajos han permitido corroborar la importancia de los receptores inhibitorios (principalmente KIR y NKG2A, descritos más adelante) durante el desarrollo y activación de las células NK. En ese sentido, se ha demostrado que del total de las células NK humanas que se encuentran en circulación, hay un porcentaje muy bajo de ellas que han sido descritas como una población de células NK no educadas (del inglés, uneducated NK cells), las cuales, carecen o presentan una reducción significativa de receptores KIR o NKG2A [41], [42]. En consecuencia, estas células son incapaces o poco capaces (si es que llegan a reaccionar) de responder hacia una célula blanco [42].

Particularmente, en los modelos murinos se ha demostrado que deleciones en la región citoplasmática del receptor Ly49A, el homólogo de los receptores KIR en humano, o mutaciones puntuales en los motivos a través de los cuales señalizan estos receptores (ITIM (del inglés, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)), bloquean la educación de las células NK. Por otro lado, el desarrollo de las células NK en ausencia de las proteínas adaptadoras a través de las cuales señalizan los motivos ITIM también conduce a la acumulación de células NK inmaduras incapaces de llevar a cabo funciones citotóxicas eficaces. En particular, la ausencia de las fosfatasas SHP-1 (del inglés, Src homology región 2 (SH2) domine-containing phosphatase-1), SHIP-1 (del inglés, SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase-1), o de la proteína adaptadora SAP (del inglés, SLAM-associated protein) conducen al desarrollo de células NK hiporreactivas [43], [44]. En consecuencia, esos resultados han permitido poner de manifiesto la importancia de los receptores inhibitorios, los motivos ITIM, las proteínas fosfatasas y/o las proteínas de la familia de SAP durante el desarrollo de las células NK.

Receptores de inhibición, receptores de activación y respuesta efectora de las células NK

Las células NK fueron descritas originalmente como células citotóxicas con una capacidad de respuesta rápida, capaces de responder inmediatamente después del reconocimiento de señales específicas (señales de estrés o moléculas no propias). Lo anterior, dió pauta a la propuesta de dos hipótesis generales que permiten explicar cómo es que las células NK llegan a reconocer y eliminar a su célula blanco. La primera de estas incluye al “*missing self*” (pérdida de lo propio), y la segunda incluye al “*induced self*” (inducción de lo propio). Por un lado, el *missing self* se refiere principalmente a la pérdida moléculas del MHC-I (ligandos para los receptores de inhibición). Por otro lado, el *induced self* se refiere a la expresión de moléculas que se inducen como consecuencia de estrés o daño celular (ligandos para receptores de activación). Por lo tanto el *induced self* como el *missing self* involucran dos estadios celulares capaces de inducir la actividad citotóxica de las células NK [45], **Figura 3**.

Las células NK exhiben de manera constitutiva receptores de inhibición y receptores de activación, asimismo, estos receptores son capaces de activarse y generar una respuesta efectora en las células NK inmediatamente después de que interaccionan con su ligando. En ese sentido, el balance de las señales emanadas a través de los diferentes receptores que exhibe una célula NK determinan su respuesta efectora [2], **Figura 3**. Un ejemplo que nos permite entender cómo es que se regula el estado funcional de estas células sería el siguiente: con respecto a los receptores de inhibición, si se encuentra un mayor número de receptores de activación señalizando, se favorece una respuesta citotóxica. Por el contrario, si hay un mayor número de receptores de inhibición señalizando, la respuesta citotóxica se inhibe [45]. Así mismo, tan importante como son los receptores de superficie que exhibe una célula NK, son igualmente importantes los ligandos que se expresan en la célula blanco, ya que estos determinan que receptores serán activados [2].

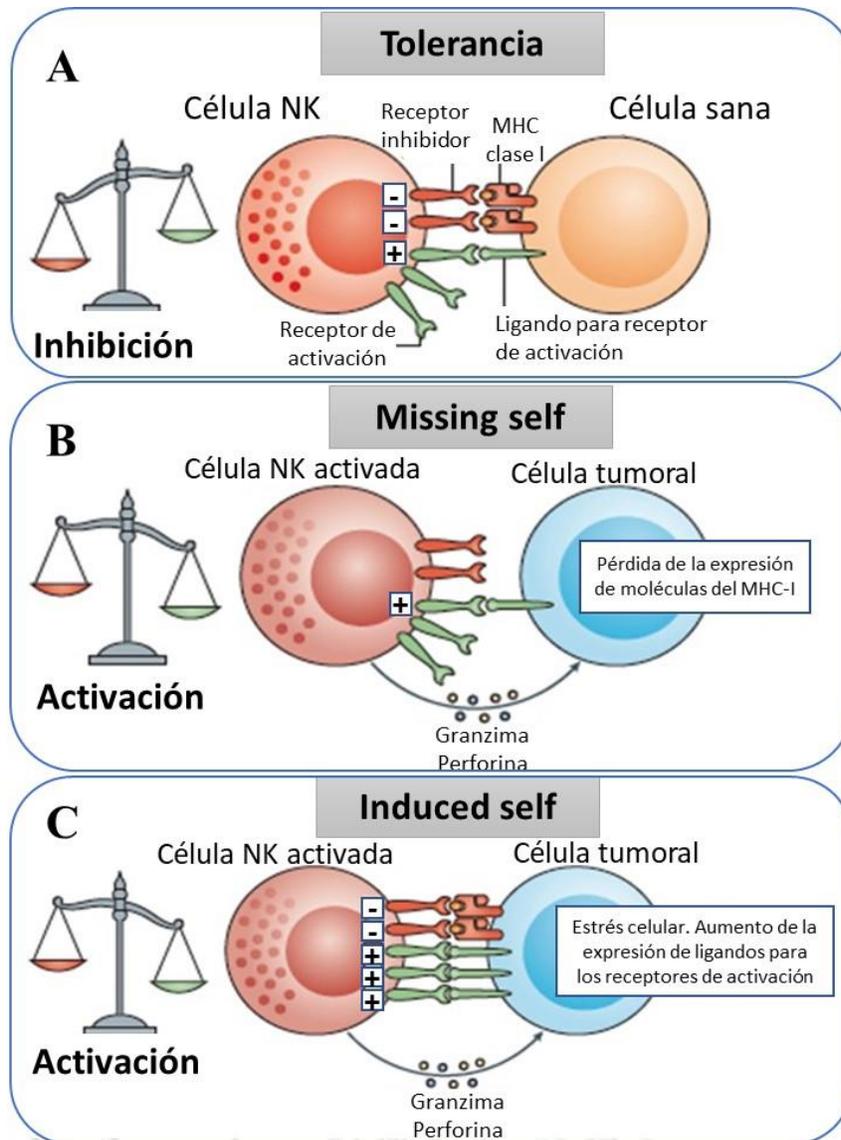


Figura 3. Activación de células NK. A durante su desarrollo y maduración, las células NK (Natural Killer) reciben un proceso de educación que les permite desarrollar una tolerancia hacia las células propias que se encuentran libres de daño (tejido sano), así mismo, los receptores de inhibición regulan de manera muy importante este proceso de tolerancia, los cuales inhiben la capacidad citotóxica de las células NK. **B** en un escenario donde las células pierden la expresión de MHC-I, un proceso conocido como “missing-self”, los receptores de activación pueden conducir a la activación de las células NK, pues no hay señales negativas que repriman las señales de activación mediadas por los receptores de activación en estas células, desencadenándose una respuesta citotóxica. **C**, Así mismo, en estados de estrés, las células blanco pueden inducir o incrementar la expresión de moléculas/ligandos (“induced-self”) para los receptores de activación sobre las células NK, por lo tanto, si hay una mayor estimulación a través de receptores de activación, con respecto a receptores de inhibición, las células NK se activan y promueven la eliminación de células blanco. Modificado de, *Vivier E, Nat Rev Immunol, 2012.*

Dentro de los principales receptores de inhibición en las células NK encontramos a los receptores KIR, los cuales, reconocen como ligando a las moléculas del MHC-I (del inglés, mayor histocompatibility complex), también conocidas como HLA-I (del inglés, human leukocyte antigen I) [45], [46], [47], **Figura 4**. De este modo, todas las células nucleadas que expresan cantidades normales de moléculas de MHC-I sobre su membrana celular externa, se encuentran protegidas de una respuesta citotóxica mediada por las células NK. En otras palabras, las células NK son incapaces de eliminar células propias que expresan niveles normales de MHC-I [26], [48].

Por otro lado, encontramos a la familia de receptores NKG2, la cual está constituida por receptores de inhibición y receptores de activación, ya hemos mencionado al receptor NKG2A, el cual, en conjunto con NKG2C y NKG2E conforma la familia de receptores NKG2 [46]. Los receptores NKG2 son una familia de lectinas tipo C, forman dímeros con la molécula CD94 y presentan una cualidad en común, los tres reconocen al mismo ligando, se unen de manera específica a la molécula HLA-E, una molécula de HLA-I no clásica [49]. NKG2A presenta una región carboxilo terminal larga en la cual se presentan varios motivos ITIM capaces de reclutar a SHP-1. Se ha demostrado que la expresión de la molécula NKG2A parece ser muy abundante durante los estadios más tempranos de maduración de las células NK, sin embargo, su expresión se reduce de manera significativa durante los estadios finales de diferenciación, lo cual, impacta en la capacidad citotóxica de las células NK terminalmente diferenciadas.

Por su parte, los receptores NKG2C y NKG2E carecen de motivos de señalización intrínsecos, por lo que deben asociarse a una molécula adaptadora adicional para poder señalizar. Específicamente, se asocian de manera no covalente con la molécula DAP12 (del inglés, DNAX-activating protein of 12 kDa) [46], una molécula de activación celular. DAP12 presenta motivos ITAM (del inglés, immunoreceptor tyrosine-based activation motif) los cuales, una vez fosforilados reclutan diferentes cinasas como Syk y ZAP70, cinasas involucradas durante la activación de las células NK [47]. Interesantemente, ha sido reportado que la infección por citomegalovirus parece incrementar la diferenciación y expansión de células NK positivas para NKG2C, por lo cual, una alta expresión este receptor favorece la capacidad citotóxica de las células NK [4].

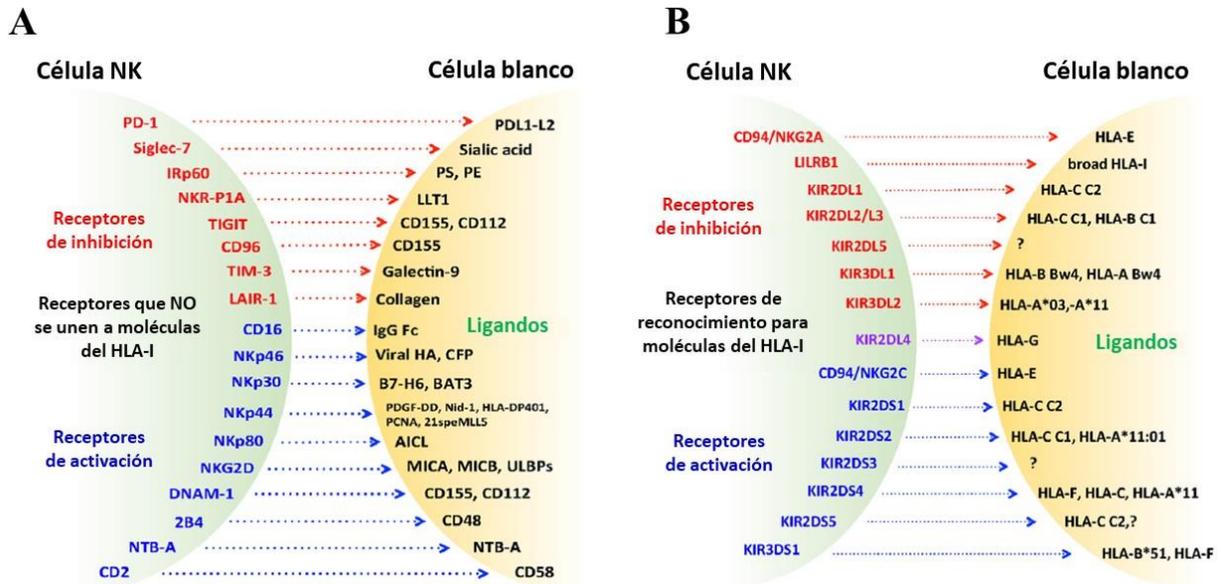


Figura 4. Las células NK expresan múltiples receptores de inhibición y activación. Las células NK expresan una gran variedad de receptores los cuales regulan su estado funcional, este repertorio de receptores lo podemos dividir en dos grandes grupos, receptores de activación y receptores de inhibición, así mismo, encontramos que estos receptores son capaces de activarse de manera independiente (receptores sin especificidad para moléculas HLA-I), panel **A**, o de manera dependiente de las moléculas de clase I (receptores específicos para HLA-I), panel **B**. Los ligandos que reconocen estos receptores pueden estar anclados a la membrana de la célula blanco o bien formar parte de la matriz extracelular (ECM, extracellular matrix). Actualmente aún hay receptores sobre las células NK de los cuales se desconocen sus ligandos (símbolo ?). También hay receptores en las células NK los cuales pueden emanar tanto señales de activación como de inhibición, un ejemplo de ellos lo vemos en color violeta. Los semicírculos en verde muestra los receptores de las células NK y los semicírculos en amarillo muestran los ligandos con los que interactúan. Modificado de, *Quatrini L, Eur. J. Immunol, 2021.*

Aparte de los receptores ya mencionados, las células NK también expresan a otras familias de receptores que impactan en su capacidad citotóxica, por ejemplo, los receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina (LILR, por sus siglas en inglés) o CD85, los cuales, también reconocen como ligando a moléculas del MHC-I, **Figura 4 y 5**. Dentro de estos, se encuentran receptores con funciones de activación o de inhibición. Los receptores LILRA (LILRA1 a LILRA6) promueven activación y son capaces de incrementar la capacidad citotóxica de las células NK, éstos señalizan a través de la cadena gamma común del receptor Fc a través de los motivos ITAM. Por otro lado, los receptores LILRB (LILRB1 a LILRB5 [o CD85J, CD85D, CD85A, CD85K y CD85C, respectivamente]) exhiben una región citoplasmática larga en la cual, presentan varios motivos ITIM capaces de reclutar a las fosfatasa SHP-1 y/o SHP-2, por lo que regulan negativamente la activación de las células

NK. Así mismo, una alta expresión de los receptores LILRB ha sido relacionada con una baja capacidad citotóxica por parte de las células NK, en consecuencia, éstos favorecen la evasión inmune y el desarrollo de procesos patológicos como el cáncer [50], [51].

Otros de los receptores de inhibición presentes en las células NK incluyen a KLRG1 (del inglés, Killer cell lectin-like receptor G1), un receptor de lectina tipo C que presenta un motivo ITIM y que recluta a SHIP-1 y SHP-2, **Figura 5**. Este receptor reconoce como ligando a cadherina E, N y R, moléculas presentes de manera basal en células epiteliales, además, parecen aumentar de manera significativa con la edad [52]. Consecuentemente, la presencia de este receptor ha sido relacionado con una baja reactividad por parte de las células inmunes. En ese contexto, la reducción de E cadherina ha sido sugerido como una estrategia para incrementar la capacidad citotóxica de las células NK y eliminar de manera más eficiente células tumorales de origen epitelial [46], [53].

Al igual que muchos receptores de inhibición en células NK, los receptores KIR también señalizan a través del reclutamiento de SHP-1 [47], [48]. Se ha demostrado que uno de los principales sustratos de la proteína SHP-1, es Vav1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina. SHP-1 promueve la inactivación de Vav1 removiendo grupos fosfatos de esta última. La activación de Vav1 ocurre durante los eventos más tempranos de la activación de las células NK, por lo tanto, la desfosforilación de Vav1 bloquea todas las vías de señalización río abajo que acontecen a través de esta proteína [54]. Vav1 participa en la activación de proteínas que están involucradas en los procesos de adhesión celular y polimerización de los microfilamentos de actina, uno de los primeros pasos que permiten la activación de las células NK, en consecuencia, si estos eventos iniciales se ven afectados; 1) o no se promueve una reacción citotóxica por parte de las células NK o 2) las células NK muestran una baja citotoxicidad hacia células blanco.

Adicionalmente, también se ha demostrado que los receptores de inhibición parecen inducir el reclutamiento de una molécula adaptadora llamada Crk (del inglés, C-terminal Src kinase) [54]. Crk es una cinasa que fosforila residuos de tirosina en la región carboxilo terminal de otras cinasas de la familia Src y esta fosforilación genera un cambio conformacional en la proteína blanco promoviendo su inactivación, en consecuencia, es capaz de regular negativamente la activación de las células inmunes [55]. Por otro lado, la

proteína arrestina β -2 también parece ser reclutada por los receptores de inhibición. La arrestina β -2 se ha visto involucrada en favorecer el reclutamiento de las proteínas SHP-1 y SHP-2, lo cual, promueve la desfosforilación de diversas proteínas de señalización implicadas en la activación de las células NK [54], [56], **Figura 6**. Básicamente, los receptores inhibitorios bloquean la activación de las células NK a través de un mecanismo que depende principalmente del reclutamiento de fosfatasa e inactivación de cinasas de la familia Src.

Es importante mencionar que muchos de los receptores de activación promueven sus vías de señalización a través de distintos motivos. En consecuencia, son capaces de reclutar diferentes proteínas adaptadoras e involucrar diferentes vías de señalización durante su activación, **Figura 5 y 6**. A continuación, se presenta una introducción general de los motivos de señalización y las principales proteínas adaptadoras involucradas en la activación de las células NK.

Motivos de señalización involucrados durante la activación de las células NK

La mayoría de los receptores de activación en las células NK generan sus vías de señalización a través de motivos ITAM, sin embargo, la región citoplasmática de estos receptores es relativamente corta, por lo que carecen de motivos de señalización intrínsecos, en consecuencia, deben asociarse a moléculas adaptadoras que presentan motivos ITAM [47], [57]. Por lo menos, encontramos tres moléculas adaptadoras que presentan motivos ITAM y con las cuales se asocian los receptores de activación en las células NK, a saber, la cadena gamma común del receptor Fc ($\text{FcR}\gamma$, por sus siglas en inglés), las cadenas ζ (zeta) de la molécula CD3 y la molécula adaptadora DAP-12 (mencionada en el apartado anterior).

Por otro lado, encontramos un segundo grupo de moléculas adaptadoras que presentan secuencias alternativas basadas en tirosina pero que también promueven activación en las células NK. Entre otras, encontramos a DAP10 (del inglés, DNAX-activating protein of 10 kDa), la cual presenta un motivo denominado YINM (donde Y es tirosina, I es isoleucina, N es asparagina y M es metionina) [54], **Figura 5**.

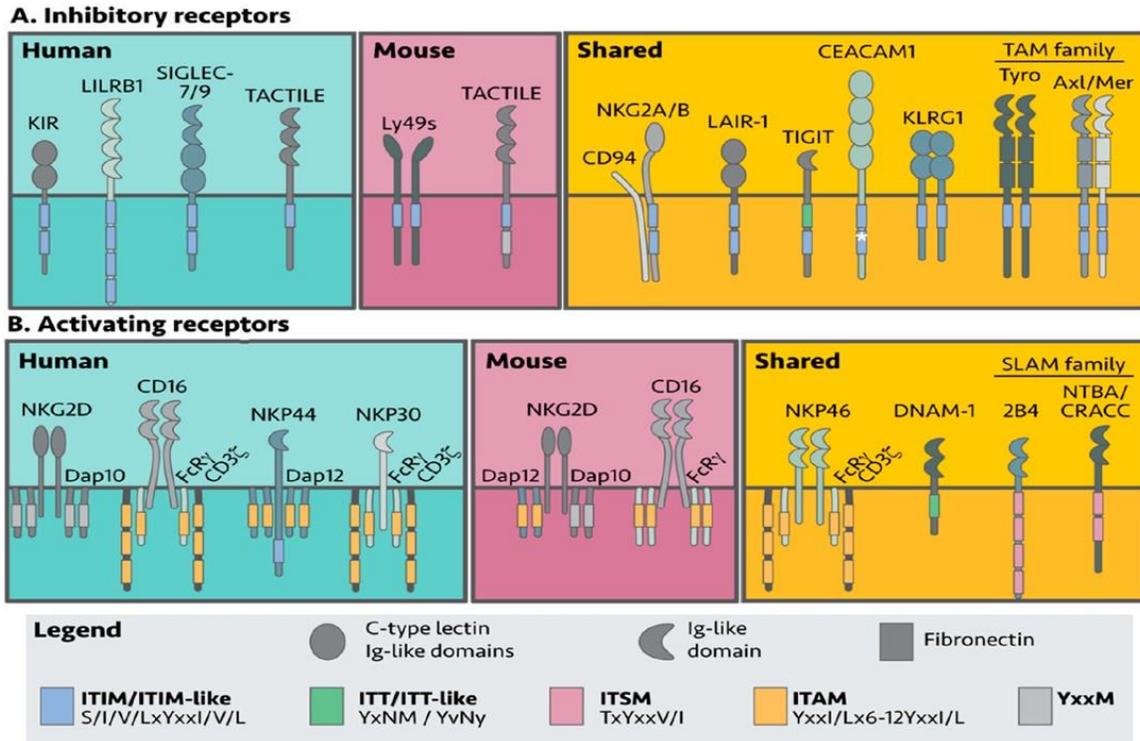


Figura 5. Características de los receptores de inhibición y activación en células NK. Las células NK expresan una gran diversidad de receptores de inhibición (**panel superior**) y activación (**panel central**) a través de los cuales se regula su estado efector, esta gran diversidad permite a las células NK emanar vías de señalización a través de diversos motivos de señalización (**panel inferior**) los cuales inhiben o activan su capacidad citotóxica. *Guzman et al., 2020.*

Finalmente, están los motivos ITSM (del inglés, immunoreceptor tyrosine-based switch motif), los cuales, son característicos de los receptores SLAM (del inglés, signaling lymphocytic activation molecule) [58], [59], una familia de receptores que más adelante se retomarán con particular atención.

Principales proteínas de señalización involucradas en la activación de las células NK

A diferencia de los receptores de inhibición que no parecen ser reubicados en sitios específicos sobre la membrana celular para generar sus vías de señalización específicas, los receptores de activación sí necesitan ser reubicados en sitios particulares, a saber, en las denominadas balsas lipídicas (del inglés, lipid rafts). Éstas son regiones ricas en colesterol donde se localizan las cinasas de la familia Src encargadas de fosforilar a estos receptores y a otras proteínas de señalización involucradas en la activación de las células NK [54].

En ese contexto, la fosforilación de los motivos ITAM por las cinasas de la familia Src genera el reclutamiento de otras cinasas que presentan dominios SH2, principalmente, a la proteína Syk y ZAP70. Así mismo, una vez que estas proteínas son activadas, fosforilan a otras proteínas como PI3K (del inglés, phosphatidylinositol-3 kinase), PLC- γ (del inglés, phospholipase C- γ), LAT (del inglés, linker for activation of T cells), entre otras [54]. Por su parte, los motivos YINM generan sitios de reclutamiento para la cinasa PI3K y para la proteína adaptadora Grb2 (del inglés, growth factor receptor-bound protein 2). En última instancia, las vías de señalización emanadas a través de estos motivos convergen en la activación de proteínas como LAT, la cual está involucrada en la activación de Vav1, fosfolipasa C γ -2 (PLC- γ 2) y MAPK (del inglés, mitogen-activated protein kinase) [54], [57],

Figura 6.

Por otro lado, los motivos ITSM generan sitios de anclaje para proteínas adaptadoras que también presentan dominios SH2. En particular, se ha demostrado que estos receptores presentan una afinidad muy alta por las proteínas de la familia de SAP, las cuales, parecen tener la capacidad de promover el reclutamiento de la cinasa Fyn y de PLC- γ [59], [60],

Figura 6.

Todas estas vías de señalización son capaces de inducir la activación de flujos de calcio y la activación o fosforilación de factores transcripcionales como NFAT, NF- κ B y ERK, lo que finalmente impacta en la secreción de citocinas y la capacidad citotóxica de las células NK.

Principales receptores de activación en células NK

La mayoría de los receptores de activación en las células NK se expresan de manera constitutiva, sin embargo, su expresión puede incrementarse durante el proceso de activación celular, asimismo, el ambiente de citocinas también puede afectar el perfil de expresión de estos receptores [47], [61]. Así mismo, diversos trabajos han permitido demostrar que alteraciones o ausencia de alguno de los receptores de activación puede comprometer la capacidad citotóxica de las células NK. Además, diferentes eventos como la secreción de citocinas inflamatorias, proliferación, adhesión y diferenciación celular también pueden verse afectados [61], [62], [63].

La respuesta efectora de las células NK se encuentra regulada por múltiples receptores de activación codificados en la línea germinal. Los primeros receptores con potentes efectos citotóxicos que fueron descritos en las células NK corresponde a los receptores de citotoxicidad natural (NCR, por sus siglas en inglés), un grupo de receptores transmembranales integrados por NKp46, NKp44 y NKp30 [61], [64]. NKp46 y NKp30 señalizan a través de la cadena gamma común del receptor Fc o a través de las cadenas ζ . Por su parte, NKp44 presenta un motivo ITIM, además, este receptor se encuentra asociado a la molécula adaptadora DAP12. Los receptores de citotoxicidad natural reconocen diversos ligandos que van desde diferentes proteínas de origen viral y tumoral hasta moléculas solubles, por lo tanto, son capaces de regular considerablemente la capacidad citotóxica de las células NK [61], [64].

Interesantemente, se ha propuesto que, ningún receptor de activación, por sí solo, es capaz de activar totalmente a una célula NK. En consecuencia, deben generarse procesos sinérgicos entre los diferentes receptores de activación. En ese contexto, mientras unos receptores regulan el proceso de adhesión, otros regulan el proceso de polarización y/o degranulación y finalmente, la cooperación entre los diferentes receptores de activación impacta en una activación total y en la capacidad citotóxica de las células NK [65], [66], [67]. Sin embargo, parece existir una excepción a esa regla, pues todo indica que el receptor CD16, por sí solo, es capaz de promover lisis celular a través de un proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés). No obstante, CD16 solamente promueve degranulación celular, pero no adhesión ni polarización celular. CD16 es un receptor de baja afinidad para la región cristalizable (Fc, por sus siglas en inglés) de las inmunoglobulinas, por lo que también se le conoce como Fc γ RIII. Éste señala a través de su asociación con la cadena γ común (CD132) y/o a través de la molécula ζ , estos últimos dos, presentan varios motivos ITAM capaces de reclutar a Syk y ZAP70. [65], [68], **Figura 5 y 6.**

Actualmente, uno de los receptores mejor estudiados en las células NK corresponde a NKG2D, un receptor que señala a través de la molécula adaptadora DAP-10 o DAP-12, los cuales presentan un dominio YINM y un dominio ITAM respectivamente. NKG2D se

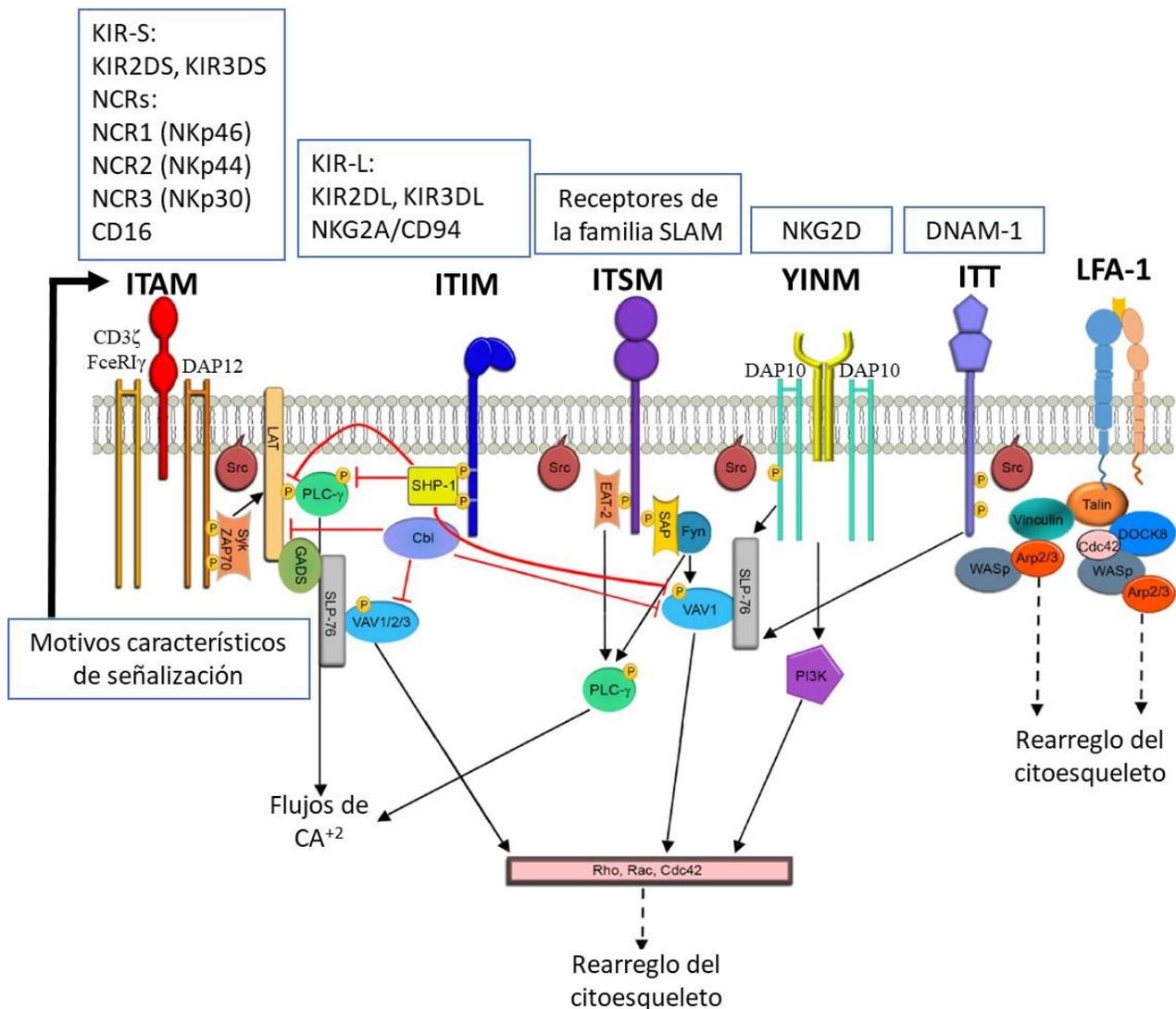


Figura 6. Los diferentes receptores de activación en las células NK señalizan a través de moléculas adaptadoras. Las diferentes familias de receptores de activación que expresan las células NK señalizan casi de manera exclusiva a través de moléculas adaptadoras, las cuales presentan distintos motivos basados en tirosinas, estos motivos pueden ser ITAM, ITSM, YINM o ITT. Mientras que los receptores de activación promueven los efectos citotóxicos de las células NK (flechas negras), los receptores de inhibición (líneas rojas) a través de motivos ITIM promueven la desfosforilación de proteínas clave durante la activación de las células NK, por lo que regulan negativamente su función efectora. En los recuadros de la parte superior podemos observar diversos receptores característicos de las células NK, por otro lado, también podemos notar las distintas proteínas citoplasmáticas que participan durante las diferentes vías de activación e inhibición en estas células. En la parte central de la figura podemos encontrar a los receptores de la familia de SLAM y las vías de señalización emanadas a través de estos receptores. Modificado de, *Ben-Shmuel et al., 2021*.

expresa en la mayoría de las células NK y reconoce distintos ligandos, por ejemplo, a las moléculas que se inducen como consecuencia de estrés celular; MIC-A (del inglés, MHC

class I chain-related protein A) y MIC-B. Además, también reconoce a las proteínas ULBP1 (del inglés, UL16-binding protein 1), ULBP2, ULBP3 y ULBP4 [69], las cuales, son expresadas por una gran cantidad de células leucémicas y otras células tumorales como carcinomas o melanomas. La diversidad de ligandos que es capaz de reconocer el receptor NKG2D, lo han colocado también como uno de los receptores con mayor impacto durante la activación de las células NK [69], **Figura 4 y 5**.

Así mismo, otro de los receptores ampliamente estudiados en las células NK es DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) también conocido como CD226, el cual se expresa de manera constitutiva por la mayoría de las células NK [70]. DNAM-1 reconoce como ligando a la molécula CD155 (el receptor de poliovirus) y CD112 (también llamado nectina-2) dos moléculas que se encuentran regulando la adhesión celular. Estas últimas, se expresan de manera constitutiva por muchas células endoteliales y epiteliales del organismo, incluso en células infectadas por virus, además, su expresión se ha visto incrementada en ciertas células tumorales [62]. DNAM-1 señala a través de un motivo muy particular denominado ITT (del inglés, immunoreceptor tyrosine tail), el cual recluta al adaptador Grb2 [70], **Figura 6**. Interesantemente, CD155 y CD112 también son ligandos para TIGIT (del inglés, T-cell immunoglobulin and ITIM domain) y CD96, dos receptores con funciones de inhibición en las células NK. En ese contexto, la inhibición de TIGIT y CD96 ha tomado un interés particular con el objetivo de incrementar la activación de las células NK y promover una respuesta citotóxica mucho más potente hacia células blanco de origen tumoral [71].

Por otro lado, dentro de los receptores que regulan la activación de las células NK también se incluyen a las integrinas, las cuales actúan principalmente como moléculas de adhesión o migración celular. Los ligandos que reconocen las integrinas incluyen componentes de la matriz extracelular, selectinas u otras moléculas de adhesión [72]. Las células NK expresan principalmente a la integrina LFA-1 (del inglés, lymphocyte function-associated antigen 1) y VLA-4 (del inglés, very late antigen-4). LFA-1 reconoce como ligando a las moléculas ICAM-1 (del inglés, intercellular adhesion molecule-1), ICAM-2 e ICAM-3, moléculas que se expresan de manera constitutiva por células endoteliales [54]. Por otro lado, VLA-4, reconoce como ligando a la molécula VCAM (del inglés, vascular cell adhesion molecule)-1 [54]. La vía de señalización de las integrinas es compleja e involucra

el reclutamiento de proteínas como la cinasa Pyk2 (del inglés, proline-rich tyrosine kinase 2), otras proteínas como filamina, talina, vinculina, kindlina 3 o cinasas como Syk (por mencionar algunas) En consecuencia, las integrinas son de suma importancia durante la formación de una sinapsis inmune y durante los eventos celulares más tempranos de la activación de las células inmunes. Particularmente, en las células NK humanas se ha demostrado que LFA-1 parece estar promoviendo adhesión y polarización, pero no la degranulación, lo anterior, sigue resaltando la necesidad de una cooperación entre diferentes receptores que regulan otros eventos como la degranulación [65], [68].

Si bien actualmente se tiene una comprensión más clara acerca de la biología y los mecanismos moleculares que acontecen durante la activación de las células NK humanas, también es cierto que aún se desconocen los mecanismos y el papel exacto de otros receptores presentes en estas células. Particularmente, los receptores SLAM, una familia que ha tomado importancia debido a su abundante expresión y a las diversas funciones que cumplen en las células inmunes [58].

Debido que los receptores SLAM forman parte central de este proyecto, a continuación, se prestará mayor atención a ellos, poniendo particular interés en el receptor SLAMF7.

Los receptores SLAM se expresan de manera diferencial sobre células inmunes

Los receptores SLAM son glicoproteínas transmembranales de tipo I, que se encuentran presentes en células de origen hematopoyético. Así mismo, es posible encontrar de 3 a 5 receptores de esta familia en cada célula inmune [58]. Los receptores SLAM presentan dos o cuatro dominios del tipo de las inmunoglobulinas (dominio variable y dominio constante), un solo dominio transmembranal y una secuencia citoplasmática larga que puede presentar uno o varios motivos ITSM [58], [59]. La familia de receptores SLAM está conformada por el prototipo SLAM (CD150), 2B4 (CD244), SLAMF7 (CD319), Ly9 (CD229), NTBA (CD352, Ly108 en ratón) y CD84 [58].

Así mismo, una de las características de los receptores SLAM es que la mayoría de ellos presentan interacciones homofílicas (actúan como autoligandos), es decir, un receptor reconoce como ligando a otra molécula del mismo tipo expresada en una célula adyacente o célula blanco. Por ejemplo, el receptor SLAMF7 reconoce como ligando a SLAMF7, Ly9

reconoce a Ly9, etc., la única excepción a esta regla es 2B4, el cual reconoce como ligando a CD48, una molécula anclada a la membrana celular externa de las células de origen hematopoyético [58], [59], [73]. En consecuencia, dado que los receptores SLAM se expresan de manera exclusiva por células de origen hematopoyético, este tipo de receptores son activados bajo el contexto de las interacciones que se establecen entre las diferentes células hematopoyéticas [58], [59]. En ese contexto, diversos trabajos han permitido demostrar que los receptores SLAM se encuentran regulando numerosos eventos celulares que van desde el desarrollo celular, supervivencia celular, adhesión, inmunidad humoral, fagocitosis, citotoxicidad, incluso se han visto involucrados en procesos autoinmunes [44], [58], [74]. Adicionalmente, se ha sugerido que los receptores SLAM impactan durante el proceso de educación de las células NK, por un lado, incrementando la tolerancia a tejido sano y por otro lado, incrementando su capacidad citotóxica [44], [75].

Los receptores SLAM señalizan a través de su asociación con las proteínas adaptadoras de la familia SAP [76]. Estas últimas, también se expresan diferencialmente en células inmunes. Presentan un tamaño de 132 aminoácidos, un dominio SH2 y una región carboxilo terminal de 23 aminoácidos que resulta ser esencial para promover activación en las células NK [58], [59]. La familia de SAP está conformada por el prototipo SAP y la proteína EAT-2 (del inglés, Ewing's sarcoma-associated transcript-2). Así mismo, ambas se expresan en células NK humanas. En ratón, existe un tercer miembro relacionado a esta familia de proteínas; ERT (del inglés, EAT-2-related transducer), el cual se expresa de manera exclusiva por células NK. ERT se encuentra como un pseudogén en humano [58].

Así mismo, se ha demostrado que la interacción entre los receptores SLAM y las proteínas SAP es facilitada por las cinasas de la familia Src, las cuales, inducen la fosforilación de las tirosinas presentes en los motivos ITSM y favorecen el reclutamiento de SAP y EAT-2, a través del dominio SH2 de estas últimas. SAP y EAT-2 presentan una homología del 47%, asimismo, cada una de estas proteínas presentan características específicas, por un lado, SAP presenta una arginina en la posición 78 que es esencial para promover activación en las células inmunes. Por otro lado, en la región carboxilo terminal de EAT-2 y de ERT se encuentran dos tirosinas, una localizada en la posición 120 y otra en la

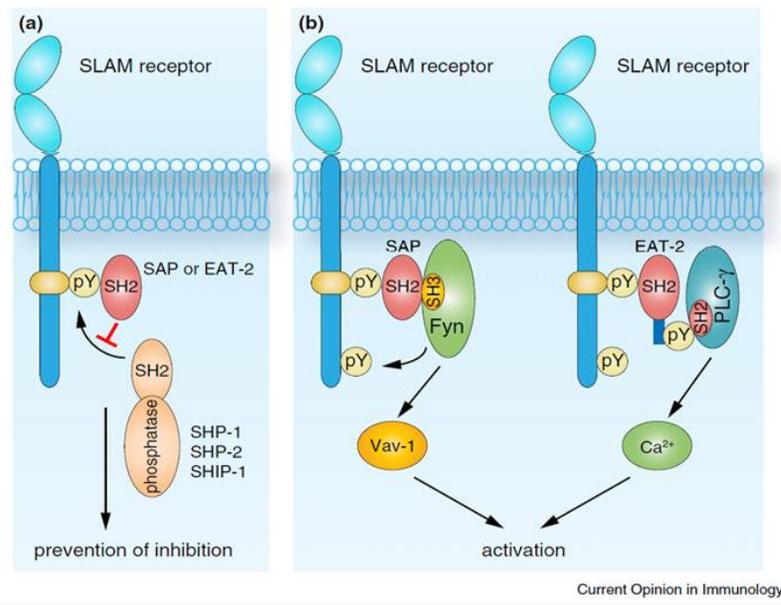


Figura 7. Influencia de las proteínas de SAP sobre los receptores SLAM (a) La activación de los receptores de la familia de SLAM promueven el reclutamiento de proteínas que presentan dominios SH2, particularmente se reclutan a las proteínas de la familia de SAP (SAP y EAT-2), y este reclutamiento favorece la activación de diferentes células inmunes. Sin embargo, SAP y EAT-2 no solamente promueven la activación de los receptores SLAM, sino que también evitan el desarrollo de respuestas inhibitorias al desacoplar a estos receptores de otras proteínas que también presenten dominios SH2, por ejemplo, se ha propuesto que las fosfatasa SHP-1, SHP-2 o SHIP-1 también pudieran ser reclutadas. (b) a través de su dominio SH2, SAP recluta a la cinasa Fyn, la cual es capaz de fosforilar a otras tirosinas presentes en el receptor, así como también a Vav-1. Por su parte, las tirosinas fosforiladas en la región carboxilo terminal de EAT-2 recluta a PLC- γ y esta última promueve flujos de calcio en células NK. Por lo tanto, EAT-2 y SAP promueven activación de células inmunes a través de distintos mecanismos. *Wu & Veillette, 2016.*

posición 127 a través de las cuales median activación celular. EAT-2 humano solamente presenta una tirosina localizada en la posición 127 [58], [59], [77], [78], **figura 7.**

Por otro lado, ha sido reportado que alteraciones en alguna de las proteínas de la familia SLAM o SAP, pueden afectar la función efectora de las células inmunes y conducir al desarrollo de ciertas patologías [58], [59]. De manera notable, mutaciones en el gen que codifica para la proteína SAP (SH2D1A), resulta en una inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (XLP1, X-linked lymphoproliferative disease). Ésta alteración conlleva a una susceptibilidad a infecciones por el virus de Epstein Barr y el desarrollo de un síndrome linfoproliferativo, un desorden inmune catalogado como una inmunodeficiencia primaria

[58], [79]. Los sujetos que presentan mutaciones en el gen SH2D1A son incapaces o poco capaces de generar (si es que se llega a generar) la proteína SAP.

El virus de Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés) infecta linfocitos B maduros, sin embargo, en sujetos sanos inmunocompetentes, las células T CD8⁺ y las células NK eliminan eficientemente a estas células infectadas. No obstante, sujetos que desarrollan mutaciones en el gen SH2D1A presentan una citotoxicidad celular reducida, en consecuencia, desarrollan linfocitosis, posteriormente, estas células pueden infiltrarse en la médula ósea, favoreciendo el desarrollo de otras patologías como HLH (del inglés, hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome), otro trastorno de inmunodeficiencia grave que afecta principalmente en la infancia [74], [79], [80]. Este tipo de patologías dio pauta para estudiar a SAP de una manera más detallada, y se demostró que SAP está involucrada en los procesos de adhesión celular, en consecuencia, la ausencia de SAP compromete el proceso de adhesión celular [59], [74], [78]. Recordemos que un evento esencial para la eliminación de células blanco es la adhesión celular, por lo que una incapacidad para formar conjugados celulares puede evadir la respuesta inmune celular y como resultado, conducir al desarrollo de infecciones patológicas [19].

En relación con lo anterior, y con la finalidad de estudiar a estas proteínas de manera más específica, se generaron distintos modelos celulares y animales que han permitido conocer los diversos eventos celulares que se encuentran regulados por los receptores SLAM y las proteínas SAP. Interessantemente, estos modelos permitieron demostrar que, en ausencia de SAP, EAT-2 y/o ERT, los receptores SLAM se convierten en receptores con potentes efectos de inhibición. En consecuencia, el contexto ambiental durante el entrecruzamiento de los receptores SLAM determina si estos receptores promueven activación o inhibición en las células inmunes [73], [77], [78], [81], [82]. Así mismo, estos modelos también permitieron reproducir el fenotipo observado en sujetos con mutaciones en el gen SH2D1A; en ese contexto, la ausencia de la proteína SAP (modelos murinos knockout), parece estar reduciendo de manera significativamente la capacidad citotóxica de las células NK [73], [77].

Actualmente, se sabe que los mecanismos moleculares a través de los cuales los receptores de la familia de SLAM promueven señales de inhibición, parecen ser a través del reclutamiento de las fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP-1, moléculas que al presentar dominios

SH2 también pueden ser reclutadas por las tirosinas fosforiladas de los motivos ITSM [59], [82]. Así mismo, también se ha propuesto que la cinasa Csk (del inglés, C-terminal Src kinase) puede estar siendo reclutada a los motivos ITSM. Csk promueve la fosforilación de proteínas de la familia Src en la región carboxilo terminal lo cual genera un cambio conformacional de la proteína blanco y su consecuente inactivación, de esta manera, regula negativamente la activación de las células inmunes. Sin embargo, aún se requieren estudios futuros para corroborar de manera contundente estas hipótesis.

Por otro lado, lo que sí está claro es que para que los receptores SLAM medien señales de inhibición, las proteínas de la familia SAP no deben estar presentes [59]. Por lo tanto, las proteínas adaptadoras de la familia de SAP han sido clasificadas no solamente como proteínas que promueven señales de activación celular, si no también, como interruptores moleculares que desacoplan a los receptores SLAM de promover señales de inhibición [58], [59].

Aun con todo el trabajo que demuestra el papel esencial de los receptores SLAM y las proteínas de la familia de SAP en células inmunes, conocemos relativamente poco sobre la contribución individual exacta de la mayoría de los receptores SLAM en cada una de las diferentes células humanas [58]. Particularmente de SLAMF7 (CRACC (del inglés, CD2-like receptor activating cytotoxic cells) o CS1), un receptor presente en células citotóxicas humanas. Por un lado, se ha demostrado que este receptor es capaz de promover activación e incrementar la capacidad citotóxica de las células NK [83], [84], [85]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares exactos a través de los cuales SLAMF7 impacta durante la activación de las células NK humanas.

Por otro lado, la función de SLAMF7 en células NK de origen murino ha sido bien descrita y se ha demostrado que éste incrementa la capacidad citotóxica de células NK hacia células blanco de origen hematopoyético [81]. Sin embargo, en ausencia de EAT-2, pero no de SAP, SLAMF7 promueve señales inhibitorias, reprimiendo la capacidad citotóxica de las células NK. Lo anterior ha permitido establecer que SLAMF7 se encuentra señalizando de manera específica a través de EAT-2 [81].

Célula blanco

Célula blanco

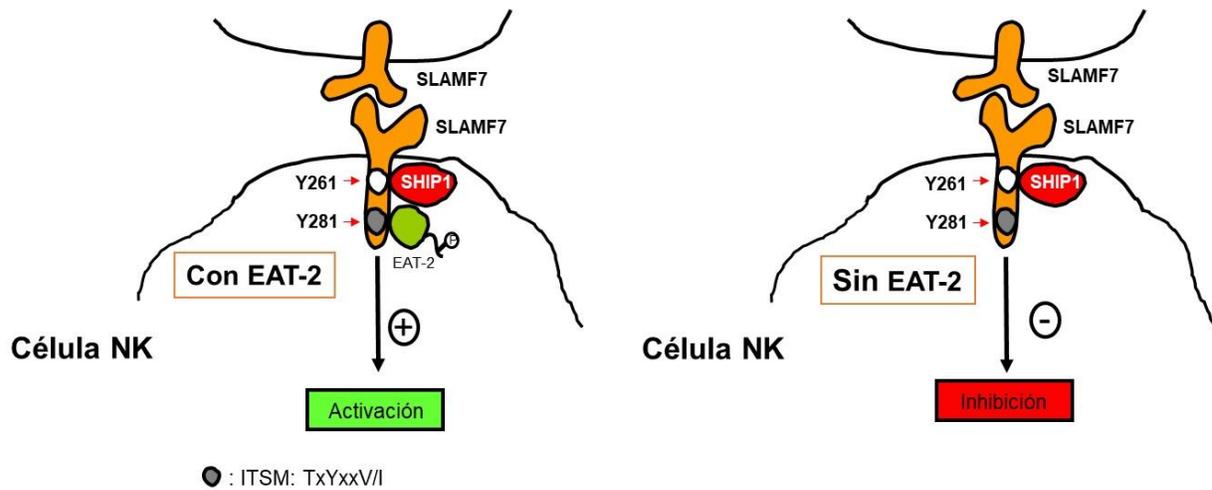


Figura 8. Modelo a través del cual SLAMF7 murino señala en células NK. Las células NK expresan SLAMF7 y EAT-2, por lo que una vez que se promueve el entrecruzamiento de SLAMF7 en células NK se favorece la capacidad citotóxica de estas células, y este efecto se logra después del reclutamiento de EAT-2 a la tirosina 281 (Y281) localizada dentro de un motivo ITSM. Por otro lado, cuando se involucra la activación de SLAMF7 en ausencia de EA-2, se promueven potentes efectos inhibitorios, y este efecto depende de la tirosina 261 (Y261), la cual parece reclutar a la fosfatasa SHIP-1. Este modelo muestra que SLAMF7 exhibe una función dual en células murinas, el cual va a depender de la presencia o ausencia de EAT-2. Modificado de, *Veillette et al., 2009.*

SLAMF7 presenta dos tirosinas potencialmente fosforilables

A continuación, se describen con mayor detalle los mecanismos moleculares a través de los cuales SLAMF7 regula la activación de las células NK murinas (el modelo mejor estudiado).

Se conoce que la región citoplasmática de SLAMF7 murino (mSLAMF7) presenta dos tirosinas altamente fosforilables, una localizada en la posición 261 (tirosina 261; Y261) y la otra en la posición 281 (Y281). Además, se ha demostrado, que cada una de estas tirosinas regulan eventos específicos, por un lado, la Y281 se encuentra embebida en un dominio ITSM y al parecer es la responsable de reclutar a la proteína EAT-2. Por otro lado, la Y261 parece ser la responsable de mediar un efecto inhibitorio en las células NK y este efecto parece depender del reclutamiento de la fosfatasa de lípidos SHIP-1 [81]. Por otro lado, aunque las tirosinas responsables de mediar activación e inhibición se encuentran localizadas en posiciones distintas, se ha demostrado que únicamente en ausencia de EAT-2,

la tirosina 261 parece ser capaz de reclutar a SHIP-1 y promover inhibición celular [59], [81], [82], **Figura 8**.

A pesar de los antecedentes anteriores, se desconocen los mecanismos moleculares exactos a través de los cuales el reclutamiento de EAT-2 bloquea la interacción de la tirosina 261 con otras proteínas, sin embargo, se han sugerido una serie de hipótesis las cuales tratan de explicar este efecto. Por un lado, se propone que una vez que EAT-2 se une a la tirosina 281, se genera un cambio conformacional en la región citoplasmática de SLAMF7, en consecuencia, la tirosina 261 queda inaccesible. Por otro lado, también se ha sugerido que ocurre un impedimento estérico entre EAT-2 y cualquier otra proteína que pudiera ser reclutada a la tirosina 261 [58], [59].

Por otro lado, y al igual que en ratón, SLAMF7 humano también presenta dos tirosinas altamente fosforilables; una en la posición 284 (Y284) y otra en la posición 304 (Y304), las cuales, corresponden a las tirosinas homologas que se encuentra en ratón [86], [87]. Debido a que la Y304 se encuentra en un motivo ITSM, se ha sugerido que esta es la responsable de reclutar a EAT-2 y promover la función citotóxica de las células NK. Así mismo, también se piensa que la Y284 es la responsable de mediar un efecto inhibitorio [86]. Sin embargo, hasta la fecha no hay ningún ensayo funcional que lo demuestre, por lo cual, resulta necesario seguir evaluando el papel de SAMF7 en células humanas y contribuir en la generación de nuevo conocimiento que permita corroborar tales proposiciones.

EAT-2 recluta a PLC- γ en células NK

Ya se ha venido mencionando que SLAMF7 señala a través de EAT-2, un efecto que parece compartirse tanto en ratón como en humano [86]. Además, también se ha comentado que EAT-2 presenta una o dos tirosinas en su región carboxilo terminal, las cuales son indispensables para promover activación. En ese contexto, se ha demostrado que mutaciones puntuales de la Y127 (humano), o de la Y120 y Y127 (ratón), bloquean la capacidad que tiene EAT-2 para promover activación en las células NK [77], [88].

Adicionalmente, también ha sido reportado que la fosforilación de EAT-2 en su dominio carboxilo terminal (Y120 y/o Y127), parece estar promoviendo el reclutamiento de la proteína PLC- γ , a través del dominio SH2 de esta última. En ese sentido, parece ser que la unión EAT-2:PLC- γ impacta en la liberación de flujos de calcio y en la activación de MAPK.

Consecuentemente, esta vía de señalización incrementa la polarización de gránulos líticos y la velocidad con la que ocurre la exocitosis de estos gránulos hacia células blanco, finalmente, este evento se traduce en una mayor citotoxicidad por parte de la células NK [77].

Además, también ha sido reportado que el entrecruzamiento de SLAMF7 en presencia de EAT-2 parece incrementar de manera significativa la fosforilación de Akt, la cual es un indicador de la activación de la cinasa PI3K. Así mismo, PI3K también regula de manera importante el proceso de polarización y degranulación en las células NK [83], [84].

SLAMF7 en otras células inmunes

SLAMF7 también ha sido explorado en linfocitos T murinos, células que no expresan EAT-2, y se ha demostrado que su entrecruzamiento conlleva a una inhibición de la proliferación celular y la producción de citocinas como IL-2, una citocina relacionada a sobrevida y proliferación [81]. Por otro lado, ha sido sugerido que el entrecruzamiento de SLAMF7 promueve una mayor citotoxicidad en células T CD8⁺ de origen humano, sin embargo, todo indica que las células T CD8⁺ no expresan EAT-2, por lo cual, se requieren mayores estudios en células T que ayuden a corroborar estas discrepancias [13], [89].

Por otro lado, en linfocitos B humanos, se ha reportado que SLAMF7 induce proliferación celular y producción de citocinas, sin embargo, se desconoce si estas funciones son o no dependientes de EAT-2, pues parece ser que las células B expresan el transcrito de EAT-2, pero la proteína no parece llegar a generarse [13], [90].

Finalmente, SLMAF7 también ha sido estudiado en otra célula del sistema inmune innato, a saber, en los macrófagos, las células residentes de tejido capaces de reconocer y eliminar una amplia variedad de agentes patógenos y células tumorales. En lo que a eso respecta, se sabe que uno de los receptores que regula de manera importante la activación de los macrófagos es la molécula SIRP (del inglés, signal regulatory protein)- α , un receptor que inhibe la capacidad del macrófago para fagocitar. Interesantemente, se ha demostrado que el simple hecho de bloquear la interacción de SIRP- α con su ligando (CD47), favorece de manera significativa la capacidad de los macrófagos para fagocitar células tumorales. En ese mismo contexto, ha sido sugerido que la fagocitosis de células tumorales se potencia aún más cuando se involucra la participación de SLAMF7 durante la activación de los macrófagos [91].

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que los receptores SLAM pueden estar regulando eventos celulares distintos y estos eventos parecen depender de dos factores principales; 1) de la célula inmune que los contenga y 2) del microambiente celular en el cual son activados estos receptores (presencia o ausencia de SAP y/o EAT-2). En ese sentido, se resalta la necesidad de seguir explorando a estos receptores y esclarecer el papel funcional y los mecanismos moleculares que se encuentran regulando en las diferentes células inmunes.

Justificación

Las células NK son las primeras células que responden contra células infectadas y/o transformadas, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares que regulan su función puede dar lugar a nuevos blancos terapéuticos de inmunoterapias.

SLAMF7 tiene una abundante expresión en células tumorales de sujetos que padecen mieloma múltiple. Por lo tanto, se ha instalado como un marcador prometedor en la terapia antitumoral. Interesantemente, las células citotóxicas tienen un papel fundamental en la regulación inmune de este tipo de tumores, por lo que elucidar los mecanismos moleculares exactos que regulan la activación de SLAMF7 en células citotóxicas puede impactar en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan generar células con una mayor capacidad citotóxica hacia este tipo de patologías.

Los receptores de la familia SLAM regulan diversos procesos celulares en las células inmunes, por lo que elucidar el papel funcional de cada miembro de esta familia resulta esencial para conocer la biología celular influenciada por estos receptores. SLAMF7 forma parte de esta familia de receptores y ha sido estudiado con particular interés en células NK murinas. En ese contexto, se ha demostrado que SLAMF7 señala a través de EAT-2 incrementando la capacidad citotóxica de las células NK. Por el contrario, en ausencia de EAT-2, SLAMF7 regula negativamente la activación de las células NK. Además, se ha sugerido que la vía de señalización de EAT-2 involucra a PLC- γ , y este binomio parece incrementar la velocidad con la que ocurre la polarización y degranulación en las células NK. Por otro lado, en células humanas, SLAMF7 ha sido estudiado con menor detalle, y no es claro si puede ejercer un efecto dicotómico similar al observado en células NK murinas. Así mismo, aunque se sugiere que SLAMF7 señala a través de EAT-2, se desconoce si esta vía de activación impacta durante la adhesión celular o durante la polarización y/o degranulación en las células NK. Por un lado, la presencia de SLAMF7 en células NK parecer estar incrementando su capacidad citotóxica. Sin embargo, no son claros los mecanismos celulares y moleculares que se promueve en estas células durante el entrecruzamiento de SLAMF7. En ese sentido, y puesto que en la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en evaluar el papel de SLAMF7 mediante anticuerpos monoclonales, en este trabajo nos enfocamos en conocer y evaluar la función y los mecanismos de acción exactos de SLAMF7 en células NK de origen humano mediante la utilización de un modelo celular que expresa el

ligando natural de SLAMF7.

Hipótesis

SLAMF7 es un receptor que promueve eventos de activación celular a través de regular eventos de adhesión, polarización o degranulación en células NK y esta función es dependiente de la participación de PLC- γ .

Objetivo general

Conocer la función y modos de acción de SLAMF7 durante las funciones efectoras mediadas por células NK.

Objetivos específicos

Conocer el patrón de expresión de SLAMF7 en células NK en diferentes estadios de diferenciación o activación.

Determinar la influencia de SLAMF7 en la capacidad citotóxica de células NK

Identificar elementos de señalización que participen en las funciones mediadas por SLAMF7 en células NK.

Materiales y métodos

Anticuerpos y citometría de flujo

Los anticuerpos utilizados en este estudio incluyen anticuerpos de BioLegend: anti-CD319 (CRACC) humano (clona 162.1, acoplado a los fluorocromos PE y PerCP/Cy5.5), anti-CD3 humano (clona OKT3, acoplado a FITC), anti-CD107a (LAMP-1) humano (clona H4A3, acoplado a PE), anti-CD56 (NCAM) humano (clona 5.1H11 acoplado a APC y a Pacific Blue), anti-CD8a humano (clona HIT8a, acoplado a FITC y a APC), anti CD4 humano (clona OKT4, acoplado a PerCP/Cy5.5), anti-CD27 humano (clona M-T271, acoplado a BD Horizon), anti-TNF- α (Mab11, acoplado a Alexa Fluor-647), anti-IFN- γ (4S.B3, acoplado a PE), anti- α -Tubulina (DM1A, acoplado a Alexa Fluor-488). Como anticuerpos no acoplados se utilizaron los anticuerpos: anti-CD3 humano (clona UCHT1), anti-CD16 humano (clona 3G8) y anti-Perforin (delta G9). El anticuerpo anti-CD319 humano (clona 162) fue purificado en el laboratorio del Dr. Fernando Esquivel. Los anticuerpos de BD biosciences: incluyen anti-CD57 humano (clona NK-1, acoplado a PE). Y los anticuerpos de TONBO biosciences incluyen: anti-CD45RA humano (acoplado a PE). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro BD FACSCanto II, IBT, UNAM. Los anticuerpos usados para los inmunoblots incluyen: p-(phospho) VAV-1 (Y160), p-SLP76 (S376), p-PLC- γ (Y783), p-p44/42 MAPK (T202/Y204), p-Akt (S473), p-PLC- γ 2 (Y759), β -actina.

Cultivo de las líneas celulares y células primarias purificadas a partir de sangre periférica

La línea celular P815 (ATCC) y las células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco™ Advanced RPMI 1640 Medium) suplementado con 5 % de suero fetal bobino (BYproducts) inactivado por calentamiento, L-glutamina, estreptomina y penicilina (Gibco™), y 2-Mercaptoetanol (Gibco™) a 1X. La línea celular NK-92 (ATCC) fue cultivada también con Medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 6.5% más 6.5 % de suero de caballo (ATCC) inactivado por calentamiento, L-glutamina, estreptomina y penicilina, 2-Mercaptoetanol y 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante (PeproTech). La línea celular HeLa y la línea celular Phoenix fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco™ Advanced DMEM Medium) suplementado con 5 % de suero fetal bobino, L-glutamina, estreptomina y penicilina. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en un ambiente humidificado

y 5 % de CO₂ (dióxido de carbono). El conteo de células y la viabilidad se realizó en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano (Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%) como colorante de viabilidad celular.

Infección retroviral

Para la expresión de SLAMF7 (ligando de SLAMF7) en la línea celular HeLa, se usó el vector retroviral pFB-GFP (addgene), un vector bicistrónico que codifica para la proteína verde fluorescente, GFP (green fluorescent protein). La secuencia codificante de SLAMF7 fue clonada en el vector pFB-GFP con los sitios de restricción para la enzima EcoRI. Una vez generada la construcción y analizada por restricción y secuenciación, el plásmido fue transfectado en la línea celular Phoenix (línea celular empaedora de virus) para generar las partículas virales infectivas.

Brevemente, en placas de 60 mm para cultivo celular se plaquearon 1.5 millones de células Phoenix y se incubaron toda la noche, al día siguiente, el sobrenadante de las células se reemplazó por medio nuevo y fueron transfectadas con 10 µg de DNA plasmídico según correspondía (pFB-GFP para el vector vacío y SLAMF7 en pFB-GFP para la expresión de SLAMF7), la transfección se realizó utilizando medio OPTI-MEM (Gibco™) y 10 µg de lipofectamina 2000 (Invitrogen™) para cada condición. Las células transfectadas fueron incubadas una noche a 37°C y 5% CO₂, al día siguiente, el sobrenadante de las células Phoenix fue retirado y reemplazado por medio RPMI nuevo y completo, después de 24 horas, el sobrenadante fue recuperado y filtrado (0.22 µm). Este sobrenadante (con las partículas infectivas) fue utilizado para transducir las células HeLa, se utilizaron 500 mil células HeLa para la transducción, se realizaron dos rondas de infección retroviral usándose 2 ml de sobrenadante filtrado para cada infección. A los 5 días posinfección se analizó la expresión de GFP por citometría de flujo. Las células HeLa positivas para GFP fueron crecidas a una densidad suficiente y sorteadas por citometría de flujo en base a la positividad para GFP, el sorting se realizó utilizando el citómetro BD FACSAria III (BD Biosciences), a cargo del Dr. Ismael Mancilla en el Instituto Nacional de Perinatología. Después del sorting celular, las células HeLa SLAMF7⁻ (vector vacío) alcanzaron una eficiencia de transducción cercana al 90 %. Por otro lado, las células HeLa SLAMF7⁺ alcanzaron una eficiencia de transducción por arriba del 95%. Además, la eficiencia de transducción para SLAMF7 alcanzó un valor

cercano al 90%. Se realizaron clonas únicamente en la construcción HeLa SLAMF7⁺ y se tomaron las más positivas tanto para GFP como para SLAMF7.

Ensayo de lisis y degranulación celular específica

Durante los ensayos de degranulación y lisis celular específica, se utilizaron células de origen humano; células NK primarias, células T CD8⁺ activadas (CTL), y la línea celular NK-92 (ATCC), una línea de células NK. La purificación de Las células NK (MojoSort™ Human NK Cell Isolation Kit, BioLegend) o CD8⁺ (Untouched™ Human CD8 T Cells Kit, Invitrogen) se realizó por selección negativa de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Después de la purificación las células fueron estimuladas; células NK con IL-2 (100 UI/ml), células T CD8⁺ con IL-2 (100 UI/ml) más PHA (1.25µg/ml), ambas por 48 horas y seguidas de una noche en arresto en medio nuevo pero libre de estímulo.

Por un lado, se realizaron ensayos de lisis celular redireccionada hacia las células P815 a diferentes relaciones celulares (efectora:blanco). En ese contexto, previo al ensayo, las células P815 fueron incubadas con anticuerpos específicos para anti-CD3, anti-CD16 y anti-SLAMF7 (1.5 µg de cada anticuerpo, 3 µg totales por millón de células en 100 uL de medio RPMI). Posteriormente, las células P815 fueron lavadas y resuspendidas en medio nuevo. Después, fueron co-cultivadas con las células NK o con las CTL. Para poder analizar la muerte celular en las células blanco, las células P815 fueron marcadas con la sonda fluorescente cellTracker green (Invitrogen™ Molecular Probes™ CellTracker™ Green) previo al ensayo.

Por otro lado, las células NK o las células NK-92 fueron incubadas con las células HeLa transducidas, HeLa SLAMF7⁻ o HeLa SLAMF7⁺, a diferentes relaciones celulares. Las células HeLa ya eran GFP positivas, por lo que no fue necesario marcarlas nuevamente.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos fondo “V” en un volumen final de 200 µL. Una vez colocados los co-cultivos, la placa fue centrifugada a 500 rpm por 4 minutos para favorecer los contactos celulares. En seguida, la placa fue incubada por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, las células fueron recuperadas en tubos para FACS y teñidas con una sonda fluorescente capaz de detectar a las células en estado apoptótico (Invitrogen™, LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit). Las células dobles

positivas (GFP⁺Violeta⁺), correspondieron a las células P815 o a las células HeLa en estado apoptótico. Las muestras fueron adquiridas por la técnica de citometría de flujo.

En ensayos similares se evaluó el proceso de degranulación celular en las células NK, NK-92 o CTL a una relación 1:1 (2×10^5 efectoras : 2×10^5 blanco). Los co-cultivos se realizaron por 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos para evaluar degranulación (presencia de CD107a sobre la membrana celular externa), específicamente sobre las células NK o CTL; (NK: CD3⁻CD56⁺ y CTL: CD3⁺CD8⁺). El porcentaje de degranulación para las células NK correspondió a las células CD56⁺CD3⁻CD107a⁺ y, para CD8 correspondió a las células CD8⁺CD3⁺CD107a⁺. Todas muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

En algunos ensayos, las células NK-92 fueron pretratadas por 30 minutos con inhibidores farmacológicos selectivos, U73122 (inhibidor de PLC- γ) a una concentración de 2.5 μ M, LY294002 (inhibidor de PI3K) a una concentración de 25 μ M o con DMSO. Posteriormente, las células NK-92 fueron lavadas dos veces y resuspendidas en medio nuevo a la densidad deseada. El U73122 y el DMSO se adquirieron de SIGMA, el LY294002 fue de Merck.

Evaluación de citocinas intracelulares

La expresión de citocinas se evaluó en células primarias y en la línea celular NK-92. Por un lado, las PBMC fueron purificadas a partir de concentrados leucocitarios. Posteriormente, se aislaron a las células NK por selección negativa de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Después de la purificación, las células NK fueron estimuladas con IL-2 (100 UI/ml) por 48 horas y seguidas de una noche en arresto con medio completo pero libre de IL-2. Posteriormente, las células NK primarias y las células NK-92 fueron co-cultivadas con las células HeLa SLAMF7⁻ o SLAMF7⁺ en una proporción 1:1 (2×10^5 : 2×10^5) en placas de 96 pozos fondo V, centrifugadas 3 minutos a 500 rpm e incubadas 4 o 7 horas a 37°C, el ensayo se realizó en presencia de Brefeldina A (5 μ g/mL) (SIGMA) y Golgistop (5 μ L/mL) (BD). En seguida, las células fueron teñidas para las moléculas CD3 y CD56. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas (BD Cytofix/CytopermTM) y teñidas para TNF- α e IFN- γ con anticuerpos específicos. El porcentaje de expresión para

cada citocina se evaluó de manera específica en células NK en base a la positividad para CD56⁺ TNF- α ⁺ e IFN- γ ⁺ pero negativas para CD3⁻, las muestras fueron adquiridas por citometría de flujo.

Microscopía confocal

Los ensayos de microscopía se realizaron en cubetas especiales para microscopía (chambered coverglass, Lab-Tek). Las cubetas fueron incubadas una noche con 500 μ L por pozo de poli-L-lisina al 0.01% (SIGMA), en total 2 mL por placa. Posteriormente, las placas fueron lavadas dos veces con PBS (phosphate buffered saline) 1X pH=7.4. Seguido del lavado, se plaquearon 2.5×10^5 células HeLa SLAMF7⁻ o HeLa SLAMF7⁺ en cada pocillo, según correspondiera. La placa se incubó una noche para permitir la adhesión celular. Al día siguiente, se marcaron células NK-92 con cellTracer Orange (Invitrogen™ Molecular Probes™ CellTracker™ Orange) a una concentración de 50 μ M por 30 minutos a 37°C. Las células NK-92 recién teñidas y las células HeLa plaqueadas se incubaron, por separado, 30 minutos a 4°C. En seguida, se colocaron 1.25×10^5 células NK-92 en cada pozo de las células HeLa SLAMF7⁻ o HeLa SLAMF7⁺ en un volumen final de 500 μ L. Después, los co-cultivos se colocaron sobre hielo por 20 minutos más para permitir que las células NK-92 hicieran contacto con las células HeLa. Posteriormente, los co-cultivos fueron incubados por cero o 20 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron recuperadas y fijadas con paraformaldehído a una concentración final de 1% por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y permeabilizadas con 300 μ l de metanol frío absoluto por 5 minutos a 4°C. las células fueron lavadas 2 veces más con PBS y teñidas con un anticuerpo primario para perforina (no acoplado) a una concentración de 1.7 μ g/mL en 300 μ L/pozo de FACS juice, 30 minutos a 4°C. Se lavaron 2 veces con PBS y se tiñeron con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG) a una concentración de 2 μ g/mL en 300 μ L/pozo de FACS juice, 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, se volvió a fijar con paraformaldehído al 1%, seguido de 2 lavados más con PBS. Finalmente, las células se dejaron en 500 μ L de PBS 1X, almacenadas a 4°C y protegidas de la luz hasta su adquisición. Las muestras se analizaron a 60 X en el microscopio invertido Olympus FV100 y se realizaron 15 cortes transversales de cada uno de los campos analizados. La adquisición se realizó en el laboratorio nacional de microscopía

avanzada (LNMA) IBT-UNAM. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (version v1.53i, NIH).

Formación de conjugados celulares

Para los conjugados celulares, las células NK-92 fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD56 conjugado con el fluorocromo APC (aloficocianina), todo en hielo y protegidas de la luz por 30 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas a 5×10^5 células por mL. Para el ensayo, se tomaron 100 μ L de la suspensión de células NK-92 y se incubaron con 100 μ L (2×10^5 células) de las células HeLa SLAMF7⁻ o HeLa SLAMF7⁺. Inmediatamente fueron centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos a 4 °C. En seguida, los cocultivos fueron incubados por 0, 5, 10 o 20 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se recuperaron las muestras, se les dio un vórtex (1 segundo, velocidad máxima), y la reacción se detuvo con 300 μ L de paraformaldehído frío al 0.5 %. Las muestras se colocaron a 4°C y fueron protegidas de la luz. Las muestras fueron adquiridas por citometría de flujo. El porcentaje de las células CD56⁺GFP⁺ (dobles positivos, células NK-92:células HeLa) representaron a los conjugados celulares.

Estadística de los resultados obtenidos

Para el análisis estadístico usamos el software GraphPad Prisma version 8.0.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. Para determinar la diferencia estadísticamente significativa usamos la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Un valor de p menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La expresión de SLAMF7 se favorece en células NK activadas

SLAMF7 se expresa de manera constitutiva en células NK humanas, sin embargo, se desconoce su perfil de expresión durante diferentes estadios de activación. En la **Figura 9** se presenta la evaluación de la expresión comparativa de SLAMF7 en células NK bajo diferentes estímulos inmunológicos y a los tiempos de 48 (A) y 72 horas (B). Inicialmente,

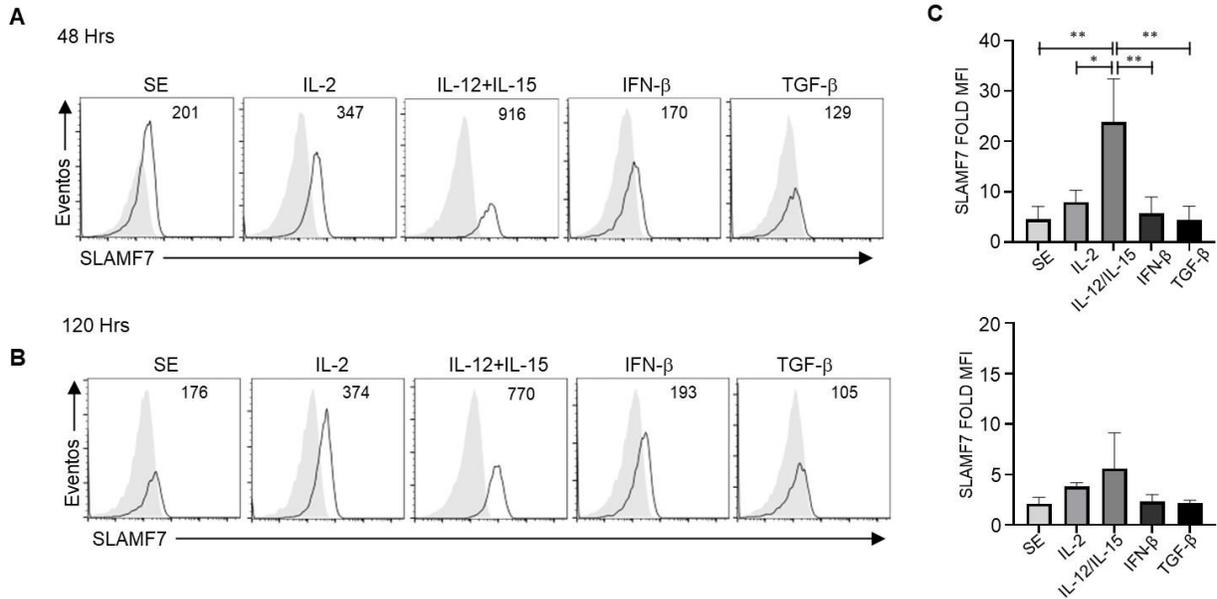


Figura 9. La expresión de SLAMF7 se incrementó en las células NK activadas. células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron estimuladas con diferentes citocinas, posteriormente, por citometría de flujo se evaluó el efecto sobre la expresión de SLAMF7 en las células CD56⁺CD3⁻ (célula NK). En **A**, células estimuladas por 48 horas y en **B**, células estimuladas por 120 horas. La expresión de SLAMF7, en cada condición, correspondió a la intensidad media de fluorescencia (MFI). De esta manera, el número dentro de cada histograma representa el valor de MFI para SLAMF7 en cada condición. **C**, análisis comparativo del efecto de los tratamientos con citocinas sobre la expresión de SLAMF7, para el tiempo de 48 horas (gráfica superior) y para el tiempo de 120 horas (gráfica inferior), donde se presenta la media y la desviación estándar de 3 ensayos independientes. Se utilizó la prueba U de Mann Whitney para comparar el MFI de cada condición, considerando una $p < 0.05\%$ como significativa. En **A** y en **B**, imagen representativa de tres ensayos realizados de manera independiente a partir de células de diferentes donadores. Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos: expresión de SLAMF7. IL-: interleucina (IL-2, IL-12 e IL-15), IFN- γ : interferón- γ , TGF- β : factor de crecimiento transformante β . SE: sin estimular. Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

se observó que las células NK mostraron una expresión constitutiva baja (10-20%). Después

de su estimulación con las citocinas IL-2 o IL-12/IL-15, la intensidad media de fluorescencia para SLAMF7 se incrementó a las 48 horas, **Figura 9A**. Por el contrario, la incubación con IFN- β o con TGF- β no ocasionó efecto sobre su expresión. En la **Figura 9B** se presenta el análisis de expresión de SLAMF7 a las 120 horas post-estímulo. Similar al tiempo de 48 horas, la incubación con IL-2 o IL-12/IL-15 incrementaron la expresión de SLAMF7, mientras que IFN- β y TGF- β no indujeron algún efecto. En la **Figura 9C** se muestra el análisis comparativo entre los estímulos y la expresión basal de SLAMF7, para el tiempo de 48 horas (panel superior) y 120 horas de estímulo (panel inferior). En base a nuestros experimentos, solo la incubación con IL-12/IL-15 indujeron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de SLAMF7 a las 48 horas ($p < 0.05$). Por su parte, aunque visualmente se observó un ligero incremento en los niveles de expresión de SLAMF7 por efecto de IL-2, no se alcanzó una significancia estadística ($p < 0.05$). Algo similar ocurrió con IFN- β y con TGF- β , que en nuestras condiciones de experimentación no indujeron efecto sobre la expresión de SLAMF7 en las células NK. Estos resultados evidencian que las citocinas que promueven activación de las células NK humanas, también favorecen la expresión de SLAMF7.

Considerando que la función biológica de los receptores de la familia SLAM depende de las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2, también se evaluó su expresión en las células NK. En la **Figura 10** se puede observar que la proteína EAT-2 se expresa a niveles bajos en células no estimuladas. Su estimulación con citocinas ocasionó un incremento en su expresión a las 48 horas. Por su parte, a las 120 horas de estimulación, las citocinas IL-2 e IL-12/IL-15 también incrementaron su expresión, mientras la incubación con IFN- β y TGF- β redujeron su expresión. Por su parte, la expresión de SAP resultó ser muy estable y similar tanto en las condiciones basales como durante la estimulación (48 y 120 horas) en ambas subpoblaciones de las células NK. Todo esto sugiere que mientras que la expresión de SAP parece ser muy estable en las células NK y no depender de la estimulación por citocinas, la expresión de EAT-2 parece estar influenciada por citocinas que afectan el estado de activación de las células NK.

Adicionalmente, en ensayos paralelos, también se evaluó la expresión de SLAMF7 en células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas bajo tres esquemas diferentes: 1) entrecruzamiento con

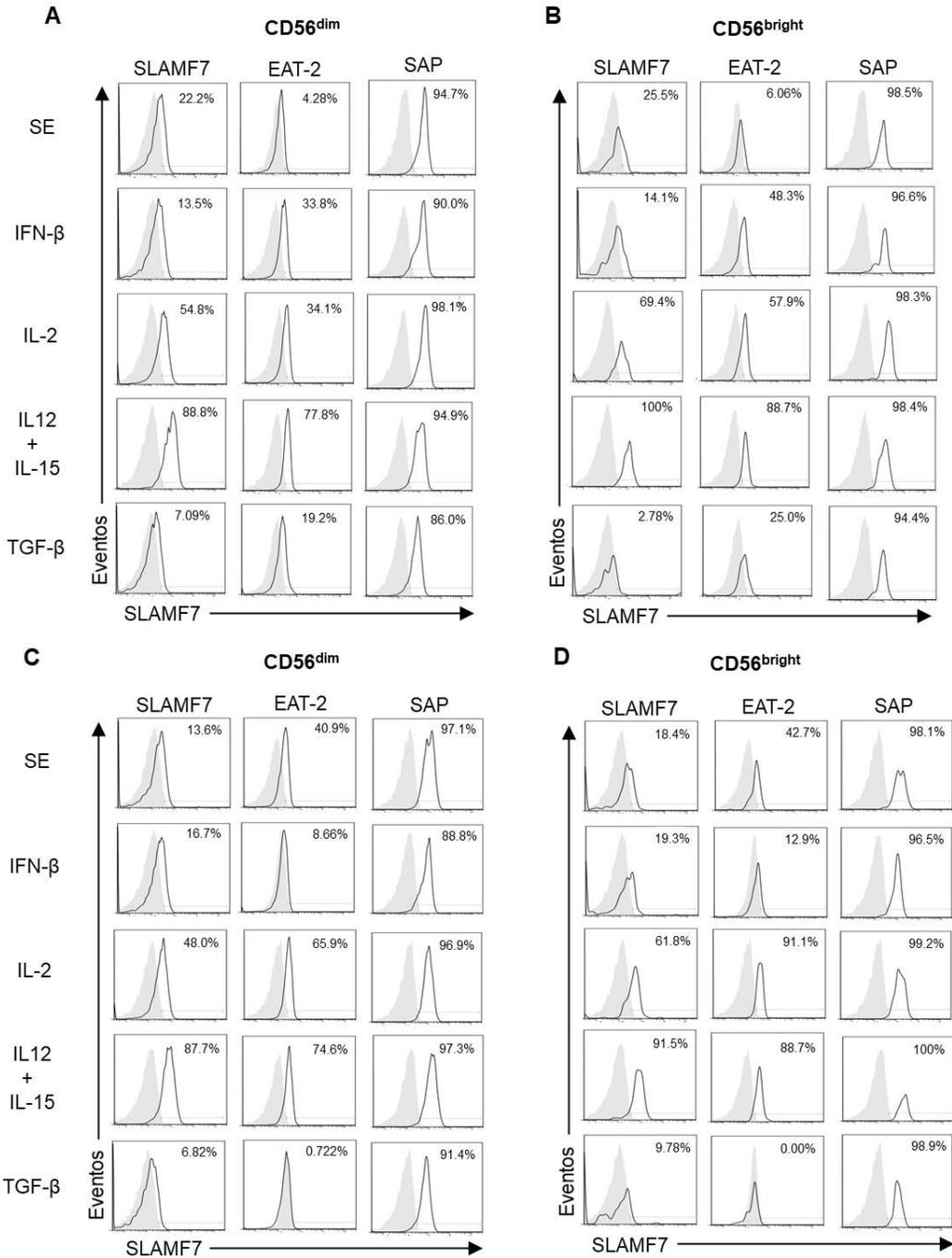


Figura 10. Expresión de SLAMF7, SAP y EAT-2 en células NK humanas activadas. Por citometría de flujo se evaluó la expresión de SLAMF7, SAP y EAT-2 en células NK humanas. El análisis se realizó en la población de células NK CD3⁺CD56^{dim} (A y C) y en las células NK CD3⁺CD56^{bright} (B y D), a las 48 horas de estímulo (A y B), y a las 120 horas de estímulo (C y D). Dentro de cada histograma se muestra el porcentaje de expresión para SLAMF7, EAT-2 o SAP con respecto al control de isotipo. Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos: expresión para SLAMF7, EAT-2 o SAP, según corresponda. Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

11, ambos tipos de células T expresaron SLAMF7 de manera basal, aunque fue a niveles bajos. Posterior a los tres tipos de estimulación y para los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas), se observó un incremento muy evidente en el porcentaje de expresión. Estos resultados sugieren que la expresión de SLAMF7 también parece favorecerse en células T activadas.

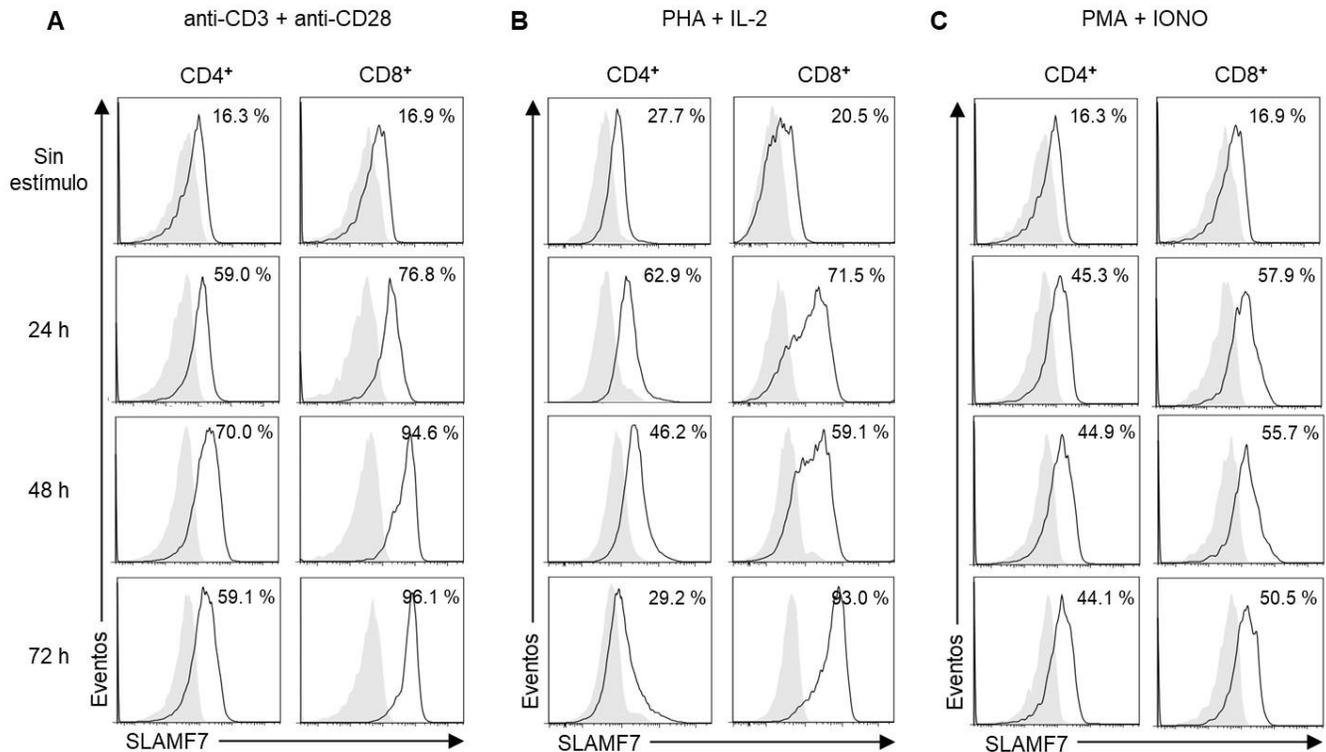


Figura 11. Expresión de SLAMF7 en células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas. PBMC fueron activadas bajo tres esquemas de activación: **A**, incubación con anticuerpos específicos (anti-CD3 y anti-CD28); **B**, incubación con PHA/IL-2; **C**, incubación con PMA/IONO. A los tiempos de 24, 48 y 72 horas. Posteriores a la aplicación del estímulo, se comparó la expresión relativa de SLAMF7 en las células T CD4⁺CD3⁺ y en las células T CD8⁺CD3⁺. Dentro de cada histograma se muestra el porcentaje de expresión para SLAMF7 con respecto al control de isotipo. Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos: expresión para SLAMF7. PHA: fitohemaglutinina, IL-2: interleucina-2, PMA: (forbol-12-miristato13-acetato), IONO: ionomicina. Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

Por otro lado, en la **Figura 12** se observa que las células T CD8⁺ naive no expresaron SLAMF7, en cambio, las células T CD8⁺ de memoria y efectoras expresaron SLAMF7 de

manera constitutiva. Por consiguiente, estos resultados también evidencian que la activación de las células T induce la expresión de SLAMF7.

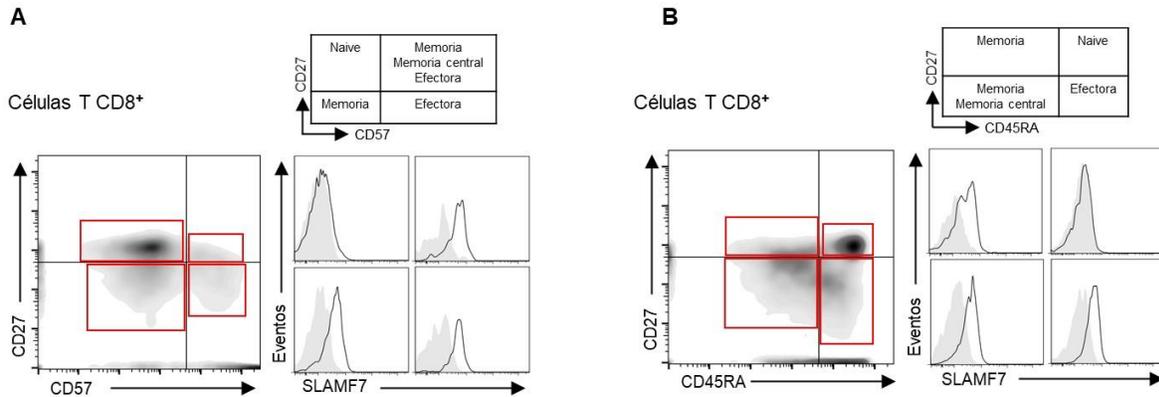


Figura 12. Expresión de SLAMF7 en diferentes subpoblaciones de células T CD8⁺. A partir de PBMC se evaluó la expresión diferencial de SLAMF7 en células T CD8⁺ naive (CD57⁻CD27⁺ y CD45RA⁺CD27⁺), efectoras (CD57⁺CD27⁻ y CD45RA⁺CD27⁻), de memoria (CD57⁻CD27⁻ y CD45RA⁻CD27⁺), y memoria central (CD57⁺CD27⁺ y CD45RA⁻CD27⁻). Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos: expresión para SLAMF7. Ensayo representativo de 2 ensayos realizados de manera independiente.

La expresión de SLAMF7 en células blanco incrementa la capacidad citotóxica de las células NK

Como una primera aproximación que nos permitiera evaluar el impacto de SLAMF7 durante la activación de las células NK humanas, se realizaron ensayos de lisis celular redireccionada hacia las células P815 (células blanco), La activación de SLAMF7 por medio de anticuerpos monoclonales específicos para SLAMF7 se observa en la **Figura 13**. Inicialmente, en la **Figura 13A** podemos ver que las células NK fueron capaces de lisar en un 80% a las células P815 que fueron incubadas con anticuerpo anti-CD16 (anti-CD16/anti-CD3 o anti-CD16/anti-SLAMF7) respecto a células P815 preincubadas con un control de isotipo. Sin embargo, el porcentaje de lisis en respuesta al entrecruzamiento de SLAMF7 fue similar al observado en respuesta al entrecruzamiento de CD16 de manera individual. Estos resultados sugieren, que el entrecruzamiento de SLAMF7 parece no tener impacto adicional sobre la activación citolítica de las células NK en respuesta a CD16.

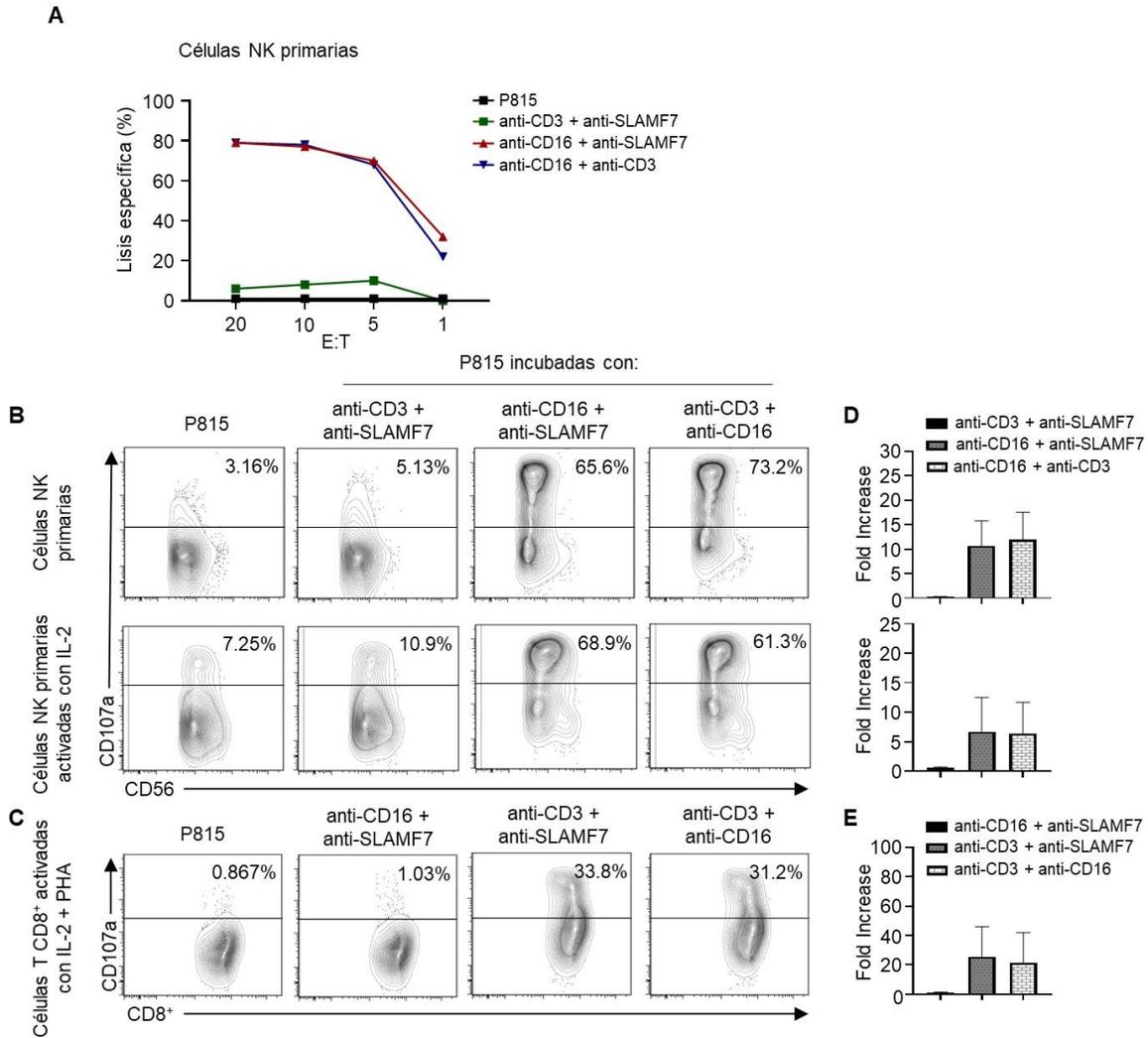


Figura 13. El entrecruzamiento de SLAMF7 mediante anticuerpos específicos no afectó la capacidad citotóxica de células NK o CTL. Las células P815 fueron preincubadas con diferentes combinaciones de anticuerpo y, posteriormente, fueron co-cultivadas por 4 horas a 37°C con células NK primarias (A) a diferentes relaciones de células efectoras (E) y blanco (T): 20:1, 10:1, 5:1 o 1:1. La lisis porcentual de las células P815 fue evaluada por citometría de flujo utilizando una sonda fluorescente específica para células en estado apoptótico. El efecto citotóxico fue también evaluado por medio de la degranulación celular, vía la expresión de la molécula CD107a, para células NK primarias en reposo (B, panel superior) o preactivadas con IL-2 (B, panel inferior). De la misma manera, se evaluó la degranulación de las CTLs (C). El porcentaje de presencia de CD107a se muestra dentro de cada gráfico. El análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la degranulación de las células NK primarias en reposo (gráfica superior) y activadas con IL-2 (gráfica inferior) se observa en D. El análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la degranulación de las células T CD8⁺ se observa en E. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de 3 ensayos independientes de 3 donadores distintos. Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

Por su parte, en la **Figura 13B** se muestran los resultados del impacto del entrecruzamiento de CD3, CD16 y SLAMF7, sobre la degranulación (presencia de CD107a en superficie) de las células NK primarias que fueron no activadas o activadas previamente con IL-2 (**Figura 13B**, paneles superiores y **Figura 13C**, paneles inferiores, respectivamente) y de CTLs (**Figura 13C**). Las células NK primarias mostraron niveles basales de degranulación en ausencia del entrecruzamiento de CD16, independientemente de si estas fueron activadas o no con IL-2. En contraste, el entrecruzamiento de CD16 indujo un incremento en los porcentajes de células NK positivas para CD107a en comparación a células NK sin estimular. Por su parte, el entrecruzamiento de SLAMF7 no modificó el porcentaje de células NK positivas para CD107a respecto a células sin estimular. En la **Figura 13D** se muestra el análisis estadístico de ensayo de degranulación en células NK primarias. Por otro lado, en la **Figura 13C** se observa que las CTL requieren el entrecruzamiento de CD3 para poder inducir la degranulación. En ese contexto, tampoco el entrecruzamiento de SLAMF7 indujo un cambio del nivel de degranulación respecto a células sin estimular o estimuladas únicamente con CD3. En la **Figura 13E** se muestra el análisis estadístico de los resultados de la degranulación en células CTLs. En conclusión, estos experimentos demuestran que el entrecruzamiento de SLAMF7 mediante el empleo de anticuerpos monoclonales no afecta la lisis o la degranulación de células citotóxicas humanas sobre los estímulos de CD3 (células T) o CD16 (células NK).

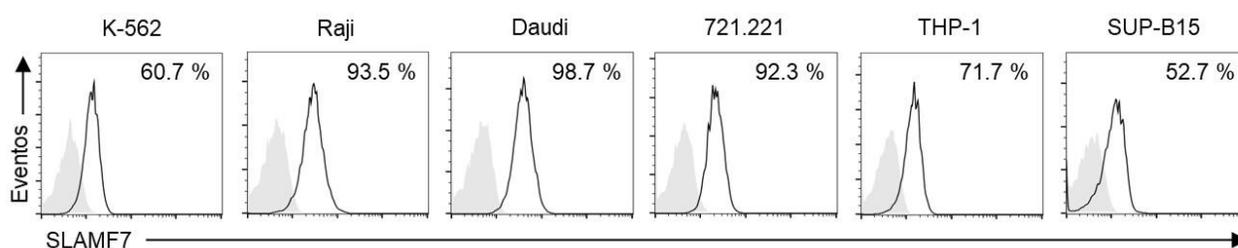


Figura 14. SLAMF7 se expresa en células tumorales de origen hematopoyético. Se evaluó la expresión de SLAMF7 en líneas celulares susceptibles a ser eliminadas por células NK. El número dentro de cada histograma representa el porcentaje de las células positivas para la expresión de SLAMF7 con respecto al control de isotipo. Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos: expresión para SLAMF7 en cada línea celular. Figura representativa de tres ensayos realizados de manera independiente. Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

Por otro lado, se evaluó el porcentaje de expresión basal de SLAMF7 en varias líneas celulares de origen hematopoyético y que son susceptibles a la lisis mediada por las células NK. En la **Figura 14** se puede observar que todas las células hematopoyéticas evaluadas

mostraron diferentes porcentajes de expresión para SLAMF7. Mientras unas mostraron el 50% de expresión, otras líneas como Raji, Daudi y 721.221 mostraron un porcentaje de expresión cercano al 100%. Todo esto sugiere que la presencia de SLAMF7 es muy frecuente en células de origen hematopoyético. En base a estos resultados se decidió evaluar la expresión de SLAMF7 en células de origen no hematopoyético como son, las células HeLa.

Como puede observarse en la **Figura 15A**, las células HeLa, en contraste a las células de origen hematopoyético, no mostraron expresión de SLAMF7. De acuerdo con estos resultados, se decidió inducir la expresión ectópica de SLAMF7 en células HeLa con la finalidad de evaluar la contribución de SLAMF7 en la activación de las células NK en un contexto más fisiológico, esto es, evaluando la interacción de SLAMF7 con su ligando natural (SLAMF7). Este modelo nos permitió evitar el uso de anticuerpos monoclonales con un estímulo más fisiológico, para conocer el impacto de SLAMF7 en la activación de las células NK. Para esto, se procedió a transfectar a la línea de células NK, NK-92 con un vector bicistrónico que además de codificar para el gen de interés (SLAMF7), también codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). En la **Figura 15A**, se evaluó la expresión de GFP y de SLAMF7 en las células HeLa transfectadas con el vector vacío o con el vector que contiene la secuencia codificante para SLAMF7.

Una vez que se obtuvieron células HeLa que no expresan o expresan establemente SLAMF7, se procedió a usarlas como células blanco en ensayos de lisis específica mediada por células NK. En la **Figura 15B** se observa que tanto las células NK primarias como las células NK-92 fueron capaces de lisar hasta un 40% de las células HeLa negativas para SLAMF7 (línea roja). Por el otro lado, las células positivas para SLAMF7 también fueron eliminadas por las células NK, sin embargo, respecto a las células HeLa SLAMF7⁺, la presencia de SLAMF7 en células HeLa incrementó la capacidad lítica de las células NK (línea azul) a niveles entre 50 y 70%. En los gráficos de barras de la **Figura 15B** se puede apreciar que entre mayor la relación de células efectoras:células blanco (E:T), mayor incremento significativo de la capacidad lítica con relación a las células HeLa que no expresan SLAMF7. Adicionalmente, en la **Figura 16A** se puede observar que las células NK primarias activadas con IL-2 también eliminaron un mayor porcentaje de células HeLa, cuando estas últimas fueron positivas para SLAMF7. Por lo tanto, estos resultados indican

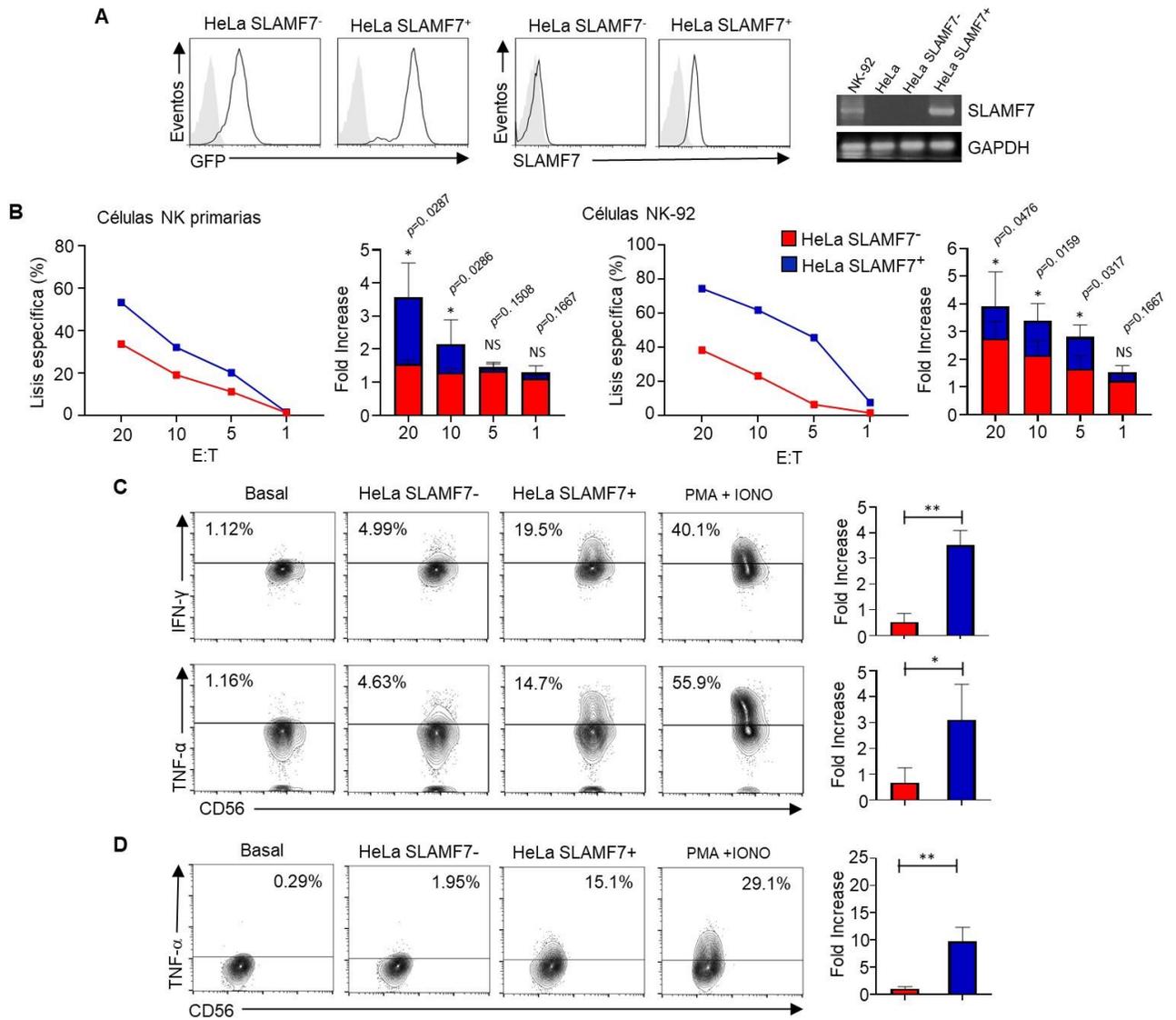


Figura 15. La expresión de SLAMF7 sobre células blanco favorece la capacidad citotóxica de las células NK humanas. **A**, histograma de la expresión de GFP y SLAMF7 en células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica solo para la proteína verde fluorescente (vector vacío) o vector que codifica para GFP y para SLAMF7. Además, por PCR tiempo final se evaluó la expresión de SLAMF7 en células NK-92, células HeLa o células HeLa transducidas, el GAPDH se utilizó como un control positivo del ensayo de PCR. **B**, ensayo de lisis celular específica a diferentes proporciones (20:1, 10:1, 5:1 y 1:1) de células NK primarias o células NK-92 versus células HeLa transducidas. Los gráficos de barras representan “las veces” de incremento entre el porcentaje de lisis de las células HeLa SLAMF7⁻ (barras rojas) y de las células HeLa SLAMF7⁺ (barras azules), con respecto a la muerte basal. También se evaluó la expresión intracelular de IFN- γ y TNF- α en las células NK preactivadas con IL-2 (**C**) y en las células NK-92 (**D**) co-cultivadas con las células HeLa transducidas. En las condiciones donde se involucró la activación de SLAMF7 la respuesta de las células NK resultó ser más potente, tanto a nivel de lisis como a nivel de síntesis de citocinas, un efecto que resultó ser estadísticamente significativo. **CONTINÚA...**

Continuación, Figura 15. En las condiciones donde se involucró la activación de SLAMF7 la respuesta de las células NK resultó ser más potente, tanto a nivel de lisis como a nivel de síntesis de citocinas, un efecto que resultó ser estadísticamente significativo. El gráfico de lisis en las células NK primarias corresponde a una figura representativa de los diferentes ensayos realizados, para las células NK-92 representa los resultados de cuatro ensayos realizados de manera independiente. La proporción de incremento, o *fold increase*, a nivel de lisis y expresión de citocinas corresponde a los resultados obtenidos de al menos tres ensayos realizados de manera independiente. Para el ensayo de lisis los co-cultivos fueron de 4 horas, para la expresión de citocinas los co-cultivos fueron de 4 (NK-92) o 7 (NK primarias) horas. Como control de activación celular se utilizó PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) más IONO (ionomicina). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05\%$ como significativa. Histogramas en gris: control de isotipo, histogramas abiertos expresión para GFP o para SLAMF7 en las células HeLa transducidas. PCR: reacción en cadena de la polimerasa, GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, GFP: green fluorescent protein, IFN- γ : interferón- γ , TNF- α : factor de necrosis tumoral α . Ensayo representativo de 4 ensayos realizados de manera independiente.

que el ligando natural de SLAMF7 incrementa el estado de activación y/o el estado citolítico de las células NK humanas respecto a células blanco que no expresan SLAMF7.

También se evaluó el impacto de la presencia de SLAMF7 en células blanco durante la síntesis de IFN- γ y TNF- α por células NK. En la **Figura 15C y D** se observa que tanto las células NK primarias como las células NK-92 mostraron niveles basales de producción de IFN- γ y TNF- α . Por su parte, en las células NK primarias preactivadas con IL-2, la participación de SLAMF7 resultó en un incremento significativo en la síntesis de IFN- γ (**Figura 15C**, paneles superiores) y TNF- α (**Figura 15C**, paneles inferiores), con relación a las células HeLa que no expresan SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁻). En la **Figura 15D**, se muestra el análisis de la síntesis de TNF- α en las células NK-92. Similar a lo observado en células NK primarias, el reclutamiento de SLAMF7 también resultó en un importante incremento significativo en la síntesis de TNF- α con relación a las células HeLa SLAMF7⁻. En los gráficos de barras de la **Figura 15C y D** (panel derecho) se muestra el análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la síntesis de citocinas tanto en células NK primarias como en células NK-92. En la **Figura 16B** se puede observar que en contraste a las células NK activadas con IL-2 o en células NK-92, la síntesis de citocinas parece ser muy baja en respuesta a la sola presencia de las células HeLa, sin embargo, el estímulo con PMA/ionomicina fue suficiente para observar un incremento significativo en la síntesis de citocinas. Estos resultados sugieren, que SLAMF7, con excepción de células NK en reposo,

es responsable de mediar un incremento significativo en la síntesis de citocinas en células NK humanas.

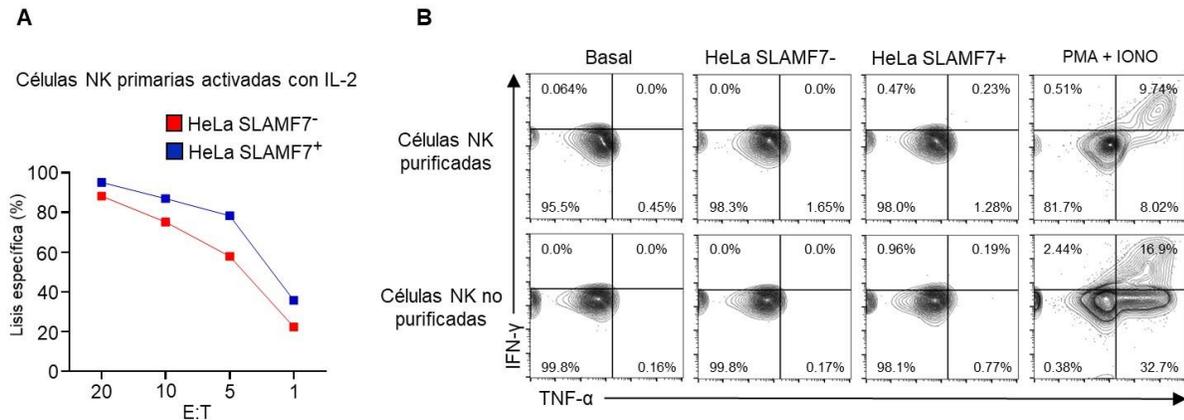


Figura 16. Entrecruzamiento de SLAMF7 en células NK activadas con IL-2 y en células NK en reposo. A, imagen representativa de un ensayo de lisis celular específica a diferentes relaciones de células efectoras (E) y blanco (T) (20:1, 10:1, 5:1 y 1:1) entre células NK primarias activadas con IL-2 versus células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para GFP (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺). La lisis porcentual de las células HeLa fue evaluada por citometría de flujo utilizando una sonda fluorescente específica para células en estado apoptótico. **B,** imagen representativa de un ensayo donde se evaluó el impacto del entrecruzamiento de SLAMF7 durante la síntesis de IFN- γ y TNF- α de células NK primarias en reposo. Células NK (panel superior) o células mononucleares de sangre periférica (panel inferior) fueron co-cultivadas con células HeLa SLAMF7⁻ o células HeLa SLAMF7⁺. Posteriormente, por citometría de flujo se analizó la síntesis de IFN- γ y TNF- α en las células NK (CD56+CD3+). Como control de activación celular se utilizó PMA (forbol-12-miristato13-acetato) más IONO (ionomicina). GFP: green fluorescent protein, IFN- γ : interferón- γ , TNF- α : factor de necrosis tumoral α . Ensayo representativo de 3 ensayos realizados de manera independiente.

SLAMF7 no afecta la formación de conjugados celulares entre las células NK y las células blanco

Una vez que las células NK reconocen a una célula blanco uno de los primeros eventos celulares que ocurren es la formación de los conjugados celulares. En base a lo anterior, y puesto que SLAMF7 incrementó de manera significativa la capacidad citotóxica de las células NK, el siguiente experimento tuvo como objetivo el evaluar el efecto de SLAMF7 sobre la adhesión celular. Para evaluar el evento de adhesión celular, las células NK-92, preteñidas para CD56-APC, se cultivaron con células HeLa que expresan o no SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁻ HeLa SLAMF7⁺ respectivamente) por diferentes tiempos de

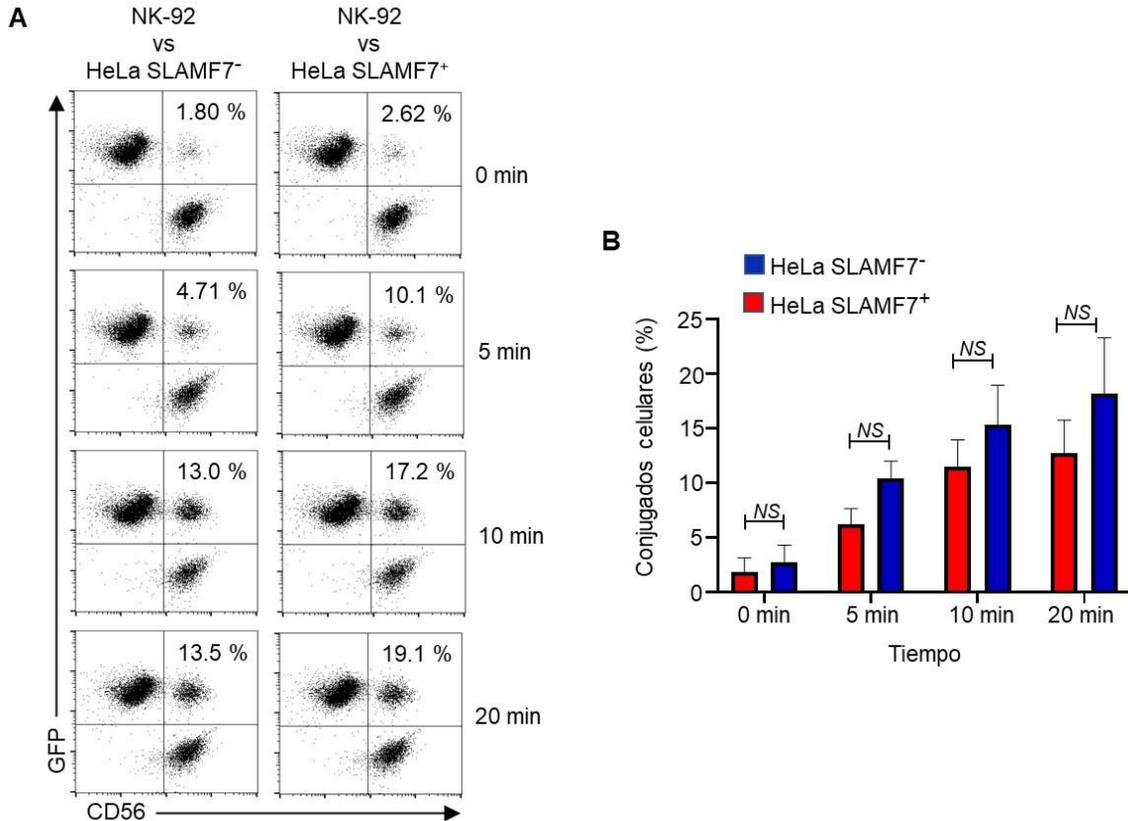


Figura 17. La adición de SLAMF7 durante la activación de células NK no impacta en la formación de conjugados celulares. **A**, células NK-92, preteñidas para CD56-APC, fueron co-cultivadas con células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para GFP (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺); NK-92 versus HeLa SLAMF7⁻ (panel izquierdo) y NK-92 versus HeLa SLAMF7⁺ (panel derecho). El porcentaje en la formación de conjugados celulares fue evaluado por citometría de flujo, dentro de cada gráfico de puntos (cuadrante superior derecho) se muestra el porcentaje de los conjugados formados entre las células NK-92 y las células blanco. **B**, análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la formación de conjugados celulares entre las células NK-92 y las células HeLa SLAMF7⁻ (barras rojas) o las células HeLa SLAMF7⁺ (barras azules), asimismo, se muestra la media y la desviación estándar de 4 ensayos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05\%$ como significativa. GFP: green fluorescent protein, NS: no significativo.

incubación. En la **Figura 17A** se muestran las gráficas de punto de citometría de flujo de un ensayo representativo al tiempo 0, 5, 10 y 20 minutos. En el eje de las ordenadas se representa a CD56, mientras que en el eje de las abscisas se representa la fluorescencia de GFP. En esta misma figura se puede observar que las células del cuadrante inferior derecho son las células NK-92 (CD56⁺), mientras que en el cuadrante superior izquierdo están presentes las células

HeLa SLAMF7⁻ (panel izquierdo), o HeLa SLAMF7⁺ (panel derecho). Las células presentes en el cuadrante superior derecho se consideran como conjugados entre las células NK-92 y las células blanco ya que en este cuadrante es posible observar la doble señal de fluorescencia correspondiente a la fluorescencia tanto de las células efectoras como de las células blanco. En la misma **Figura 17A** se puede observar que un incremento en el porcentaje de formación de conjugados entre células NK y células blanco está en función del tiempo de co-cultivo. Por otro lado, en la **Figura 17B** se muestra el análisis estadístico del impacto de SLAMF7 sobre la formación de los conjugados celulares entre las células NK-92:células HeLa SLAMF7⁻ (barras rojas) y las células NK-92:células HeLa SLAMF7⁺ (barras azules). Aunque visualmente se observa un incremento a lo largo del tiempo en el porcentaje de los conjugados celulares cuando SLAMF7 estuvo presente en las células blanco, este no alcanzó significancia estadística a ninguno de los tiempos de incubación, con relación a las células HeLa SLAMF7⁻. En base a estos resultados, se sugiere que SLAMF7 no tiene impacto, o tiene un impacto mínimo, sobre la adhesión celular entre las células NK humanas y sus células blanco.

SLAMF7 no afecta de manera significativa el evento de polarización en las células NK

La polarización de perforina ocurre durante los primeros minutos de activación de las células NK. Por lo tanto, examinamos el impacto de SLAMF7 sobre la polarización de perforina en las células NK a través de ensayos de microscopia confocal. Inicialmente, las células NK-92 se marcaron con la sonda fluorescente Orange y posteriormente se cultivaron en presencia de células HeLa que no expresan o expresan SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁻ HeLa SLAMF7⁺ respectivamente). Adicionalmente, los co-cultivos también se tiñeron con anticuerpos específicos para perforina y para tubulina, ambos acoplados a distintos fluorocromos. Para las células NK-92 se asignó el color rojo (Orange⁺), para la perforina el color amarillo (Alexa 647), y para tubulina el color verde (Alexa 488). En la **Figura 18A** se puede observar las imágenes de microscopia confocal de un ensayo representativo; en el campo claro se puede observar que una célula NK-92 se encuentra estrechamente unida a una célula HeLa SLAMF7⁻ (panel superior) haciendo contacto con a una célula HeLa SLAMF7⁺ (panel inferior). En ese contexto, se puede observar que, a los 20 minutos de estímulo, las células NK-92 polarizan los gránulos ricos en perforina hacia el sitio de contacto

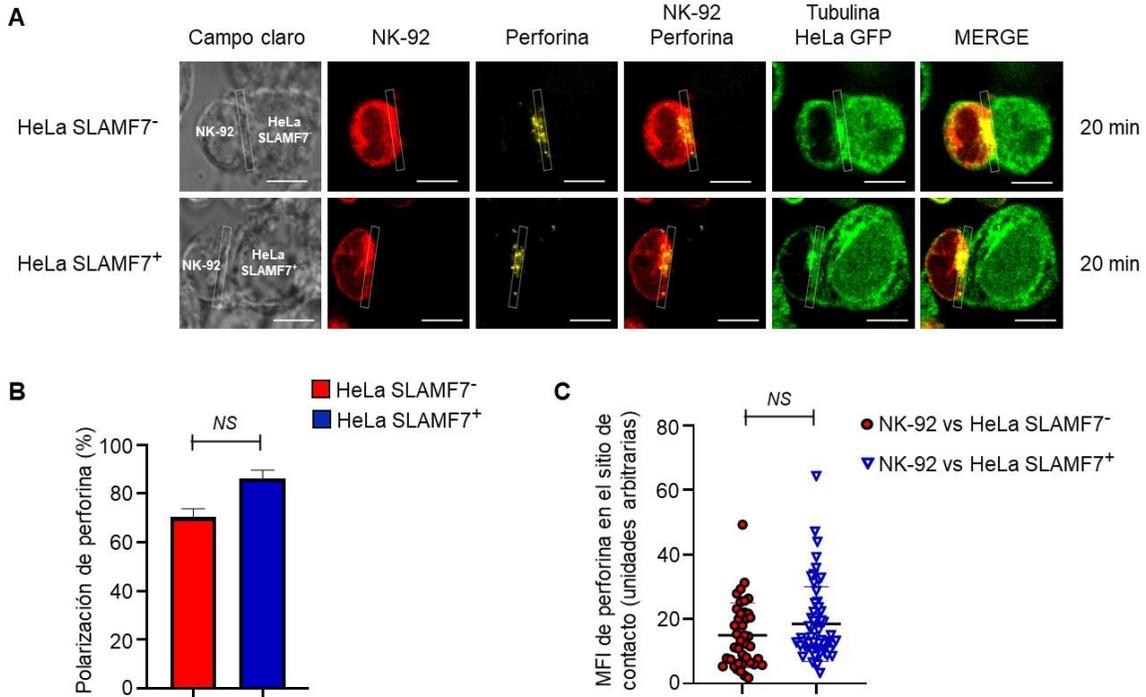


Figura 18. La expresión de SLAMF7 sobre células blanco no afectó de manera significativa la polarización en las células NK. **A**, Imágenes de microscopía confocal de un co-cultivo entre células NK-92 (CellTracker Orange⁺) y células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para GFP (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺), 20 minutos a 37°C. Adicionalmente, los co-cultivos fueron teñidos para perforina y para tubulina. Células NK-92 versus células HeLa SLAMF7⁻ (panel superior) o versus HeLa SLAMF7⁺ (panel inferior); se puede observar un campo claro (células sin fluorescencia), células NK-92 en color rojo, perforina en color amarillo, tubulina en color verde y HeLa transducidas también en color verde. **B**, porcentaje de polarización entre células NK-92 co-cultivadas con HeLa SLAMF7⁻ (barra roja) o co-cultivadas con HeLa SLAMF7⁺ (barra azul). Para evaluar el porcentaje de polarización se analizaron al menos 150 conjugados celulares (NK-92:HeLa transducidas) de cada condición, asimismo, en cada barra se muestra la media y la desviación estándar. **C**, MFI para perforina en el sitio de contacto entre células NK-92 y células HeLa SLAMF7⁻ (círculos rojos) o hacia células HeLa SLAMF7⁺ (triángulos azules), también se muestra la media y la desviación estándar. El MFI para perforina fue evaluado específicamente dentro de las células NK-92 (rectángulo que aparece dentro de las imágenes en **A**). Aunque en presencia de SLAMF7 sobre las células blanco la polarización y el MFI para perforina se incrementó, este incremento no generó una diferencia significativa con respecto a las células HeLa SLAMF7⁻. Para evaluar el MFI de perforina se analizaron al menos 50 eventos de cada condición. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05\%$ como significativa. GFP: green fluorescent protein, NS: no significativo. Experiment de 3 ensayos realizados de manera independiente.

con las células HeLa respecto a células estimuladas a tiempo cero. Esto sugiere que 20 minutos de co-cultivo es suficiente para que las células NK-92 se activen y se promueva la polarización de gránulos ricos en perforina hacia el sitio de sinapsis inmune.

Por otro lado, la **Figura 18B** muestra el porcentaje de células NK que polarizaron los gránulos ricos en perforina en respuesta a las células HeLa que no expresan o expresan SLAMF7. El porcentaje de células NK-92 que polarizaron los gránulos de perforina hacia el sitio de contacto con las células HeLa que no expresan SLAMF7 fue de alrededor del 80%. Por otra parte, la presencia de SLAMF7 en la superficie de células HeLa (barra azul) mostró un porcentaje de células NK-92 que polarizaron gránulos ricos en perforina hacia la zona de contacto con las células HeLa. Estos resultados sugieren que SLAMF7 no favorece, o tiene un impacto mínimo sobre la polarización de gránulos citotóxicos hacia la sinapsis inmunológica. Adicionalmente, se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para perforina en el área de contacto, lo cual se midió como el número de píxeles con señal para perforina en el área de contacto entre la célula efectora y la célula blanco. Nuestros análisis mostraron que el estímulo a través de SLAMF7 no incrementó significativamente la intensidad media de fluorescencia en el área de contacto entre una célula NK y la célula HeLa, independientemente de si esta expresaba o no SLAMF7 (**Figura 18C**). Estos resultados sugieren que SLAMF7 no tiene incidencia, o tiene una incidencia mínima, en regular el número de gránulos citotóxicos que migran hacia la sinapsis inmunológica.

SLAMF7 incrementa de manera significativa la degranulación celular en las células NK humanas

La adhesión, la polarización y la degranulación son los tres eventos principales a través de los cuales se regula la capacidad citotóxica de las células NK. En este sentido, el siguiente experimento tuvo como objetivo el evaluar el efecto de SLAMF7 sobre la degranulación celular de las células NK. En la **Figura 19** se puede observar un ensayo de degranulación celular (presencia de CD107a en superficie) en células NK-92 (**Figura 19A**) y en células NK primarias (**Figura 19B**) las cuales fueron activadas en ausencia de SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁻) o en presencia de SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺). En ausencia de células HeLa, las células NK-92 y las células NK primarias mostraron niveles basales de expresión para CD107a en superficie celular menores al 1%. Por su parte, la presencia de SLAMF7 en las células blanco indujo un fuerte incremento de los niveles de degranulación, medida como

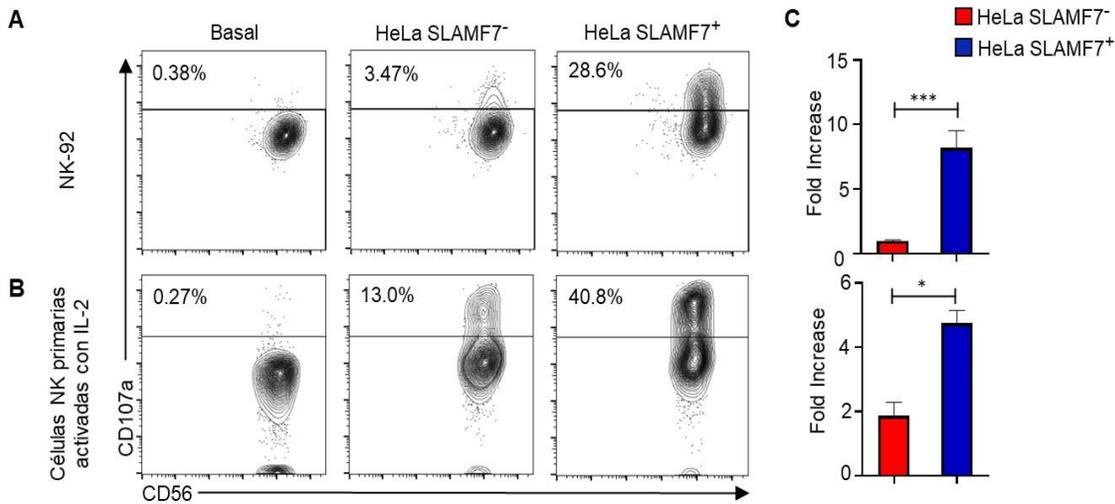


Figura 19. SLAMF7 incrementó la degranulación en células NK humanas. Células NK humanas fueron co-cultivadas con células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para la proteína verde fluorescente (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺), por 3 horas a 37°C. La degranulación fue evaluada por citometría de flujo vía la expresión de CD107a sobre la membrana celular externa de las células NK. **A**, células NK-92 co-cultivadas con células HeLa transducidas. **B**, células NK primarias preactivadas con IL-2 co-cultivadas con células HeLa transducidas. El porcentaje de expresión de CD107a se muestra dentro de cada gráfico. **C**, análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la degranulación en células NK-92 (gráfica superior) y en células NK primarias (gráfica inferior), se muestra la media y la desviación estándar de 3 ensayos realizados de manera independiente. En las condiciones donde se involucró la activación de SLAMF7 la degranulación se incrementó en las células NK, un efecto que resultó ser estadísticamente significativo con relación a las células HeLa SLAMF7⁻. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05$ como significativa. IL-2: interleucina 2.

el porcentaje de expresión de CD107a en la superficie de las células NK, alcanzando niveles de expresión por arriba de un 28%. En la **Figura 19C** se muestra el análisis estadístico del impacto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la degranulación de las células NK-92 (panel superior) y de las células NK primarias (panel inferior). De esta manera se puede decir que, SLAMF7 incrementó significativamente la capacidad de degranulación de las células NK, con relación a las células HeLa que no expresan SLAMF7⁻. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el ligando natural de SLAMF7 incrementa el proceso de degranulación en células NK humanas.

SLAMF7 promueve la activación de las células NK a través de una vía que depende principalmente de PLC- γ

Se ha propuesto que SLAMF7 promueve la activación de las células NK a través de reclutar a la proteína adaptadora EAT-2, sin embargo, aún no es claro que otras proteínas de señalización son reclutadas por SLAMF7 durante su activación [81], [84]. Las proteínas de señalización PLC- γ PI3K juegan un papel fundamental en regular distintos eventos durante la activación de células NK [48], [92]. En ese contexto, se evaluó el impacto de PLC- γ y PI3K sobre la lisis y la degranulación de células NK-92 mediada por SLAMF7. Las células NK-92 se trataron previamente con: 1) DMSO (vehículo de los inhibidores); 2) U73122 (inhibidor para PLC- γ); y 3) LY294002 (inhibidor para PI3K). Posteriormente, las células NK-92 se cultivaron en presencia de células HeLa con expresión de GFP y negativas para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁻) o positivas para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺). Como se puede observar en la **Figura 20A**, en presencia de DMSO las células NK-92 fueron capaces de lisar hasta en un 30-40% a las células HeLa SLAMF7⁻, sin embargo, con respecto a las células HeLa SLAMF7⁻, el entrecruzamiento de SLAMF7 incrementó la capacidad lítica de las células NK-92 a niveles cercanos del 80%. Por su parte, durante la inhibición de PLC- γ , la capacidad lítica de las células NK-92 se redujo alcanzando un porcentaje por debajo del 20%. Cuando la activación de las células NK-92 involucró la activación de SLAMF7, la presencia del inhibidor también redujo el porcentaje de lisis específica. El mismo porcentaje de inhibición se observó cuando la lisis específica se dirigió hacia las células HeLa que expresan SLAMF7. Por otro lado, durante la inhibición de PI3K, la capacidad lítica de las células NK-92 hacia las células HeLa se redujo hasta alcanzar niveles basales, sin embargo, el porcentaje de lisis específica en presencia de SLAMF7 fue significativamente mayor (40%) en comparación a la ausencia de SLAMF7. En base a estos experimentos, nuestros resultados sugieren que PLC- γ resulta indispensable para promover la lisis de células diana mediada por SLAMF, mientras que PI3K parece tener un impacto menos severo.

En la **Figura 20B** se muestran los resultados del impacto de la inhibición de PLC- γ o de PI3K sobre la degranulación de células NK en función o independiente de la participación de SLAMF7. De manera similar a lo que se observó en el ensayo de lisis específica, la inhibición de PLC- γ reduce el porcentaje de células NK en degranulación a porcentajes similares al observado en la condición control o sin estimular. En contraste, la inhibición de

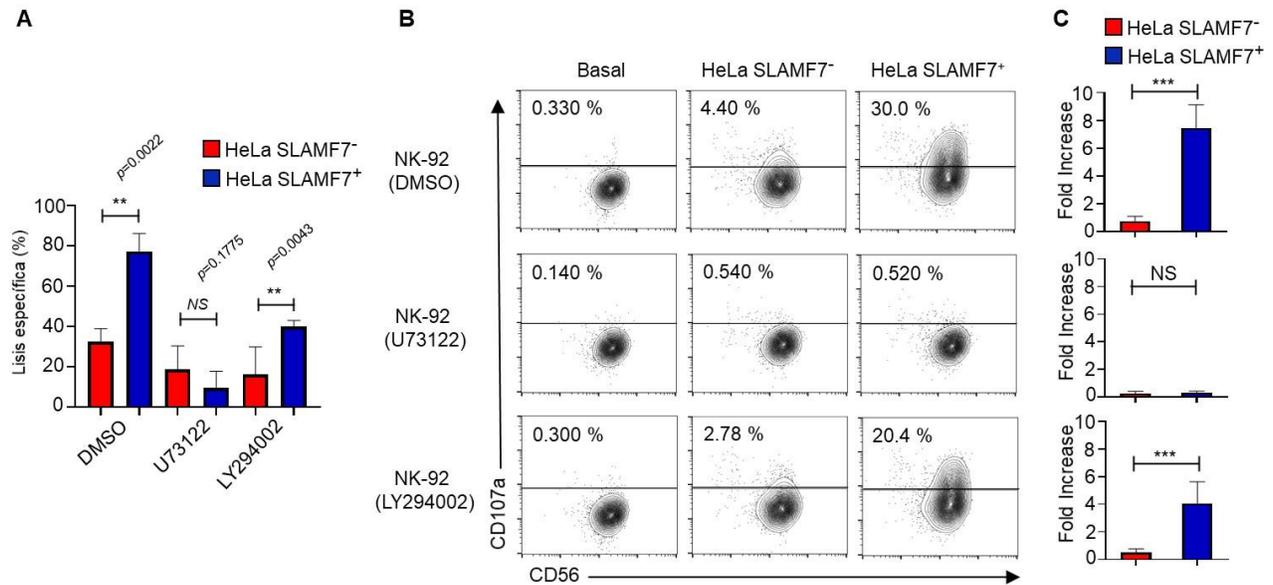


Figura 20. SLAMF7 incrementó la citotoxicidad de las células NK a través de una vía que dependió de PLC- γ . Células NK-92 fueron co-cultivadas con células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para la proteína verde fluorescente (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺). Posteriormente, se evaluó la lisis específica y la degranulación por citometría de flujo a través de una sonda fluorescente específica para células en estado apoptótico o vía la expresión de CD107a, respectivamente. A las 4 horas para lisis y a las 3 horas para degranulación a 37°C. Previo a cada ensayo, las células NK-92 fueron tratadas con: **1**) DMSO (condición control), **2**) U73122 (inhibidor para PLC- γ) o **3**) LY294002 (inhibidor para PI3K). **A**, ensayo de lisis celular específica a una proporción 10:1 (10 efectoras:una blanco), entre células NK-92 versus células HeLa transducidas. Las barras rojas representan la lisis en las células HeLa SLAMF7⁻ y las barras en azul representan la lisis en las células HeLa SLAMF7⁺. **B**, ensayo de degranulación celular entre las células NK-92 y las células HeLa transducidas, el porcentaje de presencia de CD107a en las células NK-92 se muestra dentro de cada gráfico. El análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la degranulación de las células NK-92 se observa en **C**. Durante el tratamiento con DMSO y LY294002, el entrecruzamiento de SLAMF7 sobre las células NK incrementó la lisis específica (**A**) y la degranulación celular (**B** y **C**), un efecto que resultó ser estadísticamente significativo con respecto a las células HeLa SLAMF7⁻. Por otro lado, durante la inhibición de PLC- γ (U73122), el entrecruzamiento de SLAMF7 sobre las células NK no afectó significativamente ni la lisis específica ni la degranulación celular. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de 3 ensayos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05\%$ como significativa. DMSO: dimetilsulfóxido, NS: no significativo.

PI3K, redujo parcialmente la degranulación en células NK en respuesta a un estímulo dependiente de SLAMF7, sin embargo, este porcentaje fue significativamente mayor al

observado en células NK sin estimular. La **Figura 20C** muestra el análisis estadístico de los ensayos de degranulación, y se puede observar que la presencia de SLAMF7 incrementó de manera significativa la degranulación de las células NK-92 tratadas con DMSO y con LY294002, pero no en presencia de la inhibición de PLC- γ . Estos resultados sugieren que

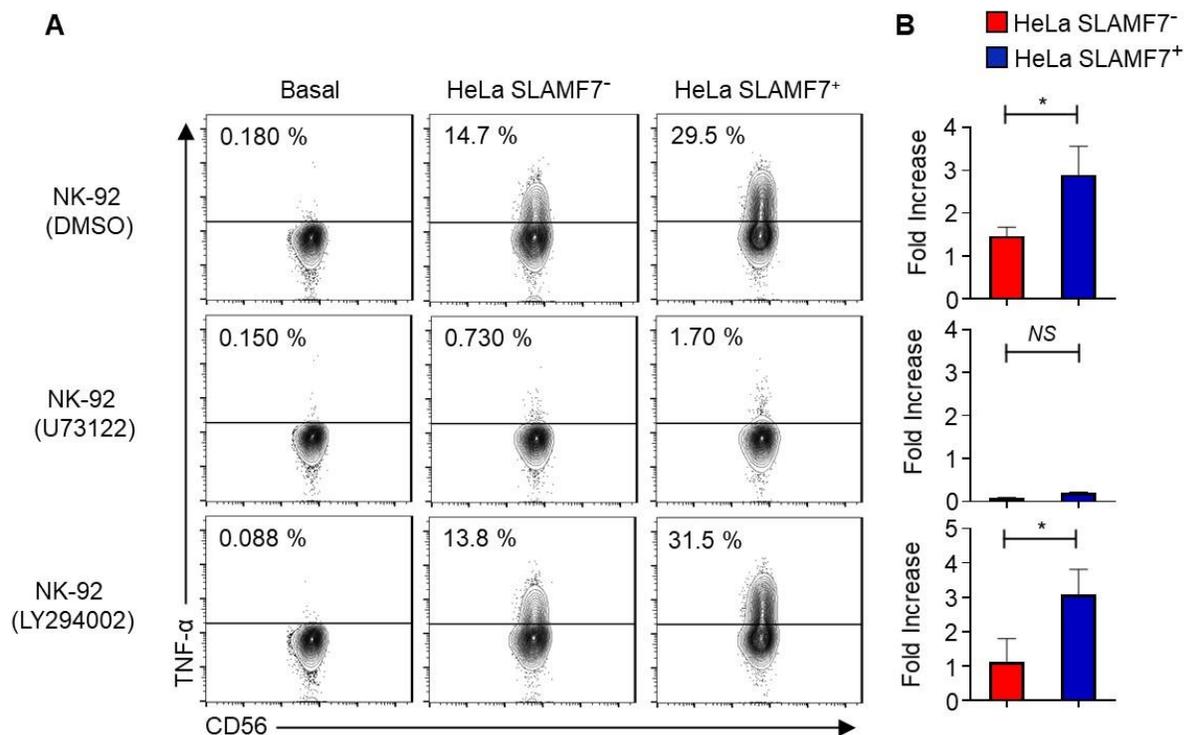


Figura 21. SLAMF7 incrementó la síntesis de TNF- α en células NK humanas a través de una vía dependiente de PLC- γ . Células NK-92 fueron co-cultivadas con células HeLa transducidas con un vector retroviral que codifica para la proteína verde fluorescente (vector vacío) (HeLa SLAMF7⁻) o que codifica para GFP y para SLAMF7 (HeLa SLAMF7⁺), cuatro horas a 37°C. Posteriormente, por citometría de flujo fue evaluada la expresión intracelular de TNF- α . Previo a cada ensayo las células NK-92 fueron tratadas con: **1)** DMSO (condición control), **2)** U73122 (inhibidor para PLC- γ) o **3)** LY294002 (inhibidor para PI3K). **A**, expresión intracelular de TNF- α en las células NK-92, el porcentaje de expresión se muestra dentro de cada gráfico. El análisis estadístico del efecto del entrecruzamiento de SLAMF7 sobre la expresión intracelular de TNF- α se observa en **B**. Durante el tratamiento con DMSO y LY294002, el entrecruzamiento de SLAMF7 incrementó la expresión intracelular de TNF- α , un efecto que resultó ser estadísticamente significativo con respecto a las células HeLa SLAMF7⁻ (**B**). Por otro lado, durante la inhibición de PLC- γ (U73122), el entrecruzamiento de SLAMF7 no afectó la expresión intracelular de TNF- α . Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de 4 ensayos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de U de Mann Whitney considerándose una $p < 0.05\%$ como significativa. DMSO: dimetilsulfóxido, NS: no significativo.

SLAMF7 requiere de la participación de esta molécula para poder incrementar o favorecer la degranulación en las células NK humanas.

En ese contexto, y considerando que la activación de las células NK también promueve la síntesis de citocinas, se evaluó la síntesis de TNF- α en las células NK-92. Similar a lo observado durante los ensayos de lisis y degranulación, En la **Figura 21A** se puede observar que SLAMF7 incrementó la producción de TNF- α y esta no se abate en presencia de DMSO o en presencia del inhibidor de PI3K (LY294002). En contraste, la inhibición de PLC- γ bloqueó casi totalmente la producción de TNF- α cuando las células NK-92 se estimularon en presencia de SLAMF7. En la **Figura 21B** se muestra el análisis estadístico de estos resultados, y se puede observar que SLAMF7 incrementó de manera significativa la síntesis de TNF- α en las células NK-92 tratadas con DMSO y con LY294002, pero no en presencia del inhibidor de PLC- γ . Estos resultados sugieren que SLAMF7 promueve la síntesis de TNF- α en las células NK a través de una vía que depende PLC- γ .

Discusión

Las células NK son linfocitos que juegan un papel fundamental tanto en la respuesta inmune innato como adaptativa [2]. Esto radica en sus atributos para ejercer una función citotóxica, así como en su capacidad para secretar citocinas proinflamatorias. La función citotóxica de las células NK está dirigida principalmente contra células infectadas por virus o células que sufren de una transformación maligna [2], [93]. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las células NK pueden lisar a sus células diana. El primero de ellos se basa en la liberación de gránulos citotóxicos que son ricos en perforina y enzimas líticas como las granzimas. Adicionalmente a este mecanismo, las células NK pueden también inducir apoptosis en células blanco a través de la activación de receptores de muerte como FasL y TRAIL [18].

La citotoxicidad que depende de la liberación de gránulos citotóxicos se conoce también como citotoxicidad natural y está regulada por una miríada de receptores de superficie celular. Estos receptores de superficie pueden inhibir o activar las funciones efectoras de las células NK. Una de las principales incógnitas respecto a entender cómo se regulan las funciones efectoras de las células NK, es entender el papel que los diferentes receptores de superficie de las células NK juegan durante la activación de las células NK [2], [48].

La primera hipótesis que permitió aproximarnos a explicar la activación de las células NK se basó en un sistema que permite registrar la ausencia de reconocimiento de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad sobre la superficie de células diana. Este sistema está compuesto por una familia de receptores que son específicos para moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Cuando estos receptores se unen a las moléculas del MHC clase I, generan señales que imposibilitan que una célula NK pueda desplegar sus funciones efectoras. Este modelo, conocido como “the *missing-self*” permitió explicar parcialmente como se regula la activación de las células NK [94].

El otro sistema que regula la activación de células NK está basado en un repertorio de receptores que una vez que unen a sus ligandos, transmite señales de activación que conllevan a que la célula NK despliegue su maquinaria citotóxica. Por lo tanto, la activación de las células NK depende de un delicado balance entre señales de activación y señales de

inhibición [2]. Dentro de los receptores de activación, se encuentra una familia de inmunoreceptores conocida como SLAM, de los cuales 2B4 es el mejor caracterizado [59], [77], [87].

Adicionalmente, las células NK también expresan al receptor SLAMF7, un receptor de activación que también forma parte de la familia SLAM. Todos los miembros de la familia SLAM señalizan a través de las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2 [76], [81], [83]. SLAMF7 se ha estudiado a detalle en modelos murinos, lo cual, ha permitido demostrar que es el único receptor de la familia SLAM que señala específicamente a través de EAT-2, en consecuencia, en ausencia de EAT-2, SLAMF7 se vuelve un receptor de inhibición [81], [84]. En células humanas el papel de SLAMF7 ha sido poco explorado y al igual que en ratón, este receptor también parece estar favoreciendo la capacidad citotóxica de las NK a través de su asociación con la proteína adaptadora EAT-2 [83]. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos celulares a través de los cuales SLAMF7 promueve una mayor activación en las células NK.

Con la finalidad de determinar el papel de SLAMF7 en células NK humanas, los primeros objetivos estuvieron enfocados en evaluar la expresión de SLAMF7 en células NK humanas estimuladas con diferentes citocinas que favorecen su estado de activación. Aunque se sabe que IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- β son citocinas que promueven supervivencia, proliferación y la capacidad citotóxica de las células NK [10], se desconoce como estas citocinas impactan en la expresión de receptores de la familia de SLAM, en particular de SLAMF7. En tal sentido, nuestros resultados mostraron que los estímulos con IL-2 e IL-12 más IL-15, los estímulos que promueven una mayor capacidad citotóxica de las células NK, también promueven una mayor expresión de SLAMF7. Por otro lado, la activación con IFN- β o con TGF- β no mostraron impacto en los niveles de expresión de SLAMF7. Los interferones tipo I regulan de manera crucial la respuesta efectora de las células inmunes ante infecciones virales, por lo tanto, el que IFN- β no afecte la expresión de SLAMF7, podría sugerir que éste no impacta durante una respuesta antiviral en células NK. Por su parte, TGF- β es una citocina con potentes efectos inmunosupresores en células NK y disminuye de manera significativa su capacidad lítica, a eso se le podría atribuir el que no se haya observado un impacto en la

expresión de SLAMF7 durante la activación con TGF- β . De modo que estos resultados sugieren que SLAMF7 impacta durante la activación de las células NK.

Por otro lado, también se evaluó la expresión de las proteínas adaptadoras a través de las cuales señalizan los receptores SLAM. Nuestros resultados mostraron que la expresión de SAP resultó ser muy estable en las células NK. Con respecto a la expresión de EAT-2, esta también se incrementó con las citocinas que promueven una mayor capacidad citotóxica en las células NK (estimulación con IL-2 e IL-12 más IL-15). En este sentido, se sugiere que las proteínas de la familia de SAP pueden tener una mayor participación en vías de señalización específicas durante la generación de células NK altamente citotóxicas.

Las células NK y las células T comparten muchos de los receptores de activación e inhibición [95], además, ambas se originan a partir de un mismo progenitor común. En ese sentido, y con la finalidad de evaluar la expresión de SLAMF7 en otras células citotóxicas relacionadas a las células NK, la expresión de SLAMF7 fue evaluada en las células T CD8⁺ y CD4⁺. Al igual que en trabajos previos, donde se demuestra que la expresión de SLAMF7 se incrementa en células T activadas [89], [96], nuestros resultados también mostraron que la activación de las células T incrementaron la expresión de SLAMF7. Además, con respecto a células T CD4⁺, parece ser que la expresión de SLAMF7 fue más estable en las células T CD8⁺. Adicionalmente, se encontró que las células T CD8⁺ naive parecen carecer de la expresión de SLAMF7 y que las células T CD8⁺ efectoras y de memoria parecen expresarlo de manera constitutiva, lo cual, también coincide con trabajos ya publicados [96]. Por lo que estos resultados sugieren que, al igual que en células NK, SLAMF7 puede estar regulando la función efectora de células T, sin embargo, aún desconocemos el papel exacto de este receptor en las células T humanas.

Por otro lado, trabajos previos han demostrado que el entrecruzamiento de SLAMF7 en células NK humanas a través de anticuerpos específicos promueven su capacidad citotóxica [83], [84]. En ese contexto, y con la finalidad de ir evaluando el papel de SLAMF7 en las células NK humanas, tratamos de reproducir los resultados ya publicados. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no logramos observar ningún efecto de SLAMF7 a través de su entrecruzamiento con anticuerpos específicos. Por lo tanto, queda por confirmar si, efectivamente, el entrecruzamiento de SLAMF7 a través de anticuerpos

incrementa la capacidad lítica de las células NK. Además, el entrecruzamiento de receptores mediante anticuerpos puede llegar a causar cierto desacuerdo debido a que estos no siempre se encuentran promoviendo activación celular. En ese sentido, el entrecruzamiento de SLAMF7 a través de anticuerpos puede que no sea el mejor modelo para evaluar su papel durante la activación de las células NK humanas.

Por otra parte, a finales del 2005 se publicó un trabajo donde se demostró por primera vez que el ligando natural de SLAMF7 incrementa la capacidad citotóxica de las células NK humanas [85]. No obstante, este efecto únicamente era posible en un escenario donde las células blanco carecían de moléculas del MHC-I. Con esos antecedentes, se expresó el ligando natural de SLAMF7 en una línea celular que ya se sabe es susceptible a ser lisada por células NK humanas, a saber, en las células HeLa, estas células fueron seleccionadas de manera estratégica, pues a diferencia de las células de origen hematopoyético, las células HeLa no expresan receptores de la familia SLAM [76], lo cual resulta ser un excelente modelo para expresar receptores de la familia SLAM y evaluar la contribución individual de estos receptores durante la activación de las células NK.

Como era de esperarse, nuestros resultados mostraron que las células NK humanas fueron capaces de promover la lisis de las células HeLa. Además, la expresión de SLAMF7 sobre estas células incrementó la capacidad citolítica de las células NK de manera significativa. Acompañado de este resultado, la expresión de SLAMF7 sobre las células HeLa también incrementó significativamente la síntesis de IFN- γ y TNF- α en las células NK preactivadas con IL-2. Por otro lado, en células NK en reposo, SLAMF7 no mostró impacto en la síntesis de IFN- γ y TNF- α . Probablemente, el que no se haya encontrado un efecto de SLAMF7 durante la producción de citocinas en las células NK en reposo, podría deberse a una expresión basal baja de SLAMF7 en estas células. Así mismo, el entrecruzamiento de SLAMF7 también incrementó significativamente la síntesis de TNF- α en las células NK-92. Por lo cual, estos resultados sugieren que el ligando natural de SLAMF7 sobre una célula blanco, que además expresa moléculas del MHC-I, promueve la capacidad citotóxica de las células NK humanas de manera significativa. Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con trabajos ya publicados donde demuestran que SLAMF7 es un receptor que promueve activación en las células NK [81], [85]. Adicionalmente, y a diferencia de los trabajos ya

publicados, también se podría sugerir que las señales generadas a través de SLAMF7 son lo suficientemente dominantes como para sobrepasar las señales inhibitorias promovidas por los receptores que se activan en presencia de moléculas del MHC-I.

Los mecanismos celulares que regulan la capacidad citotóxica de las células NK ya han sido bien descritos, y de manera general se pueden agrupar en tres eventos básicos, el primero incluye la adhesión celular, el segundo la polarización, y finalmente la degranulación celular [19]; todos estos eventos se suman para promover de manera eficiente la capacidad citotóxica de las células NK. No obstante, si alguno de esos eventos llegara a fallar, la capacidad citotóxica de las células NK se puede ver gravemente comprometida y, en consecuencia, conducir al desarrollo de patologías, principalmente inmunodeficiencias primarias [11]. En ese sentido y con el objetivo de ir elucidando los mecanismos celulares a través de los cuales SLAMF7 regula la activación de las células NK, lo siguiente fue evaluar el impacto de SLAMF7 durante la formación de los conjugados celulares. Ha sido reportado que diferentes receptores de la familia SLAM (CD84, 2B4 y CD150) pueden estar participando en procesos de adhesión celular [68], [97], [98]. Sin embargo, aún no es claro si otros receptores de la familia SLAM regulan procesos de adhesión en células humanas.

Como estaba previsto, nuestros resultados mostraron que las células NK-92 fueron capaces de formar conjugados con las células HeLa. Sin embargo, la adición del entrecruzamiento de SLAMF7 durante esta vía de activación no generó impacto durante la formación de conjugados celulares. En ese sentido, nuestros resultados coinciden con trabajos ya publicados donde se demuestra que SLAMF7 murino tampoco parece incrementar la formación de conjugados celulares [77]. Consecuentemente, el que no se haya encontrado una participación de SLAMF7 durante el proceso de adhesión celular, se le puede atribuir a la incapacidad de SLAMF7 para unir a SAP, pues ha sido demostrado que SAP favorece la capacidad citotóxica de las células NK a través de incidir en la formación de los conjugados celulares [78]. En conclusión, estos resultados indican que SLAMF7 no parece impactar durante el proceso de adhesión celular, asimismo, tampoco parece existir una función redundante entre los receptores de la familia SLAM.

Por otro lado, EAT-2 también ha sido estudiado de una manera muy completa, y se ha demostrado que esta proteína parece estar regulando la activación de las células NK a

través de incrementar la velocidad de polarización [77]. En ese sentido, y conociendo que SLAMF7 señala a través de EAT-2, tratamos de evaluar la influencia de SLAMF7 durante el evento de polarización en las células NK humanas. Nuestros resultados mostraron que las células NK-92 polarizaron hacia las células blanco, un evento esperado. Sin embargo, la adición de SLAMF7 durante esa vía de activación no impactó en polarización. Así como tampoco impactó en la intensidad de fluorescencia media para los gránulos ricos en perforina que llegaron a polarizar hacia el sitio de sinapsis. En ese contexto, se sugieren que EAT-2 puede estar regulando más de un evento celular en las células NK y este efecto parece estar en función del receptor de la familia SLAM al cual sea reclutado. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que SLAMF7 no parece influir primordialmente durante el proceso de polarización en las células NK humanas.

Hasta este punto, nuestros resultados demostraban que SLAMF7 no se encuentra impactando de manera significativa durante los eventos efectoros más tempranos en células NK, por lo que nos quedaba evaluar la degranulación celular, un evento que se caracteriza por la liberación de proteínas líticas preformadas y almacenadas en gránulos líticos en el citoplasma de las células NK [19]. Interesantemente, trabajos publicados también han demostrado que EAT-2 parece estar acelerando el proceso de degranulación en las células NK [77], sin embargo, aun conociendo que SLAMF7 señala a través de EAT-2, se desconoce si SLAMF7 impacta durante el evento de degranulación celular. En ese contexto, para identificar si SLAMF7 se encontraba regulando el evento de degranulación, se evaluó la expresión de la presencia de CD107a sobre la membrana celular externa en las células NK. CD107a es una de las principales moléculas que se encuentran ancladas a la membrana de los gránulos líticos (ricos en perforina y granzimas), y una vez que estos gránulos líticos se fusionan con la membrana celular externa de las células NK para permitir la liberación de granzimas y perforina durante el proceso de degranulación, CD107a se queda anclada a la membrana externa de la célula NK de manera temporal (2 a 3 horas) antes de volver a ser endocitada por la misma célula. Por lo tanto, la degranulación celular es directamente proporcional a la presencia de CD107a sobre la membrana de las células NK [99], [100]. Como era de esperarse, con respecto a la condición basal o control, nuestros resultados mostraron que la degranulación por las células NK se incrementó en presencia de las células HeLa. Sin embargo, cuando en esa vía de activación se involucró las señales a través de

SLAMF7, la capacidad de degranulación en las células NK se incrementó con respecto a las células HeLa que no expresan el ligando para SLAMF7. El simple hecho de expresar el ligando para SLAMF7 sobre las células HeLa aumentó significativamente la expresión extracelular de CD107a sobre las células NK. Con base en lo anterior, nuestros resultados tienen sentido desde el hecho que SLAMF7 señala a través de EAT-2. Adicionalmente, se genera evidencia contundente que demuestra el mecanismo a través del cual SLAMF7 promueve la activación de las células NK humanas. Por lo tanto, con estos resultados se sugiere de manera convincente que el ligando natural de SLAMF7 potencia la capacidad citotóxica de las células NK humanas a través de un mecanismo que depende principalmente de la degranulación celular.

Por otro lado, también se ha reportado que las vías de señalización que promueve SLAMF7/EAT-2 en células NK parecen involucrar a las proteínas PLC- γ y PI3K [77], [83], [84]. En ese sentido y entendiendo que SLAMF7 señala de manera específica a través de EAT-2, los siguientes objetivos estuvieron enfocados en evaluar la influencia de PLC- γ y PI3K durante el entrecruzamiento de SLAMF7 en células NK humanas. Una de las estrategias que nos permitió evaluar las vías de señalización a través de las cuales SLAMF7 regula la activación de las células NK fue utilizando inhibidores farmacológicos selectivos para PLC- γ y para PI3K, U73122 y LY294002 respectivamente. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de PLC- γ disminuyó significativamente la capacidad citotóxica de las células NK, además, también disminuyó significativamente la secreción de TNF- α en las células NK. Adicionalmente, las señales de SLAMF7 durante la inhibición de PLC- γ no mostraron impacto, ni a nivel de lisis ni a nivel de degranulación. Interesantemente, nuestros resultados coinciden con trabajos ya publicados en los cuales se ha demostrado que las células murinas deficientes de PLC- γ , por un lado, presentan una polarización normal, sin embargo, la capacidad de degranulación se pierde totalmente en estas células [101]. Complementario a lo anterior, en células humanas también se ha demostrado que la inhibición de PLC- γ bloquea la degranulación celular, asimismo, este efecto se observó en vías de señalización dependientes e independientes de los motivos ITAM [65]. Por lo tanto, parece ser que PLC- γ es imprescindible durante la activación de las células NK. Además, nuestros resultados también sugieren que SLAMF7 incrementa la capacidad citotóxica de las células NK a través de una vía dependiente de PLC- γ .

En ese contexto, se sabe que una de las vías de señalización que promueve la activación de PLC- γ es la cinasa de lípidos PI3K [54]. PI3K participa durante la activación de las células NK y una inhibición total de PI3K puede reducir significativamente su capacidad citotóxica [102], [103]. En ese sentido, se ha propuesto que diferentes isoformas de PI3K pueden regular eventos celulares específicos; la isoforma p110 δ parece participar en la secreción de citocinas; por otro lado, ni la inhibición de la isoforma p110 δ ni la de p110 γ parecen afectar de manera importante la respuesta citolítica de las células NK [104]. Sin embargo, se ha demostrado que las células que carecen de p110 δ son incapaces de eliminar ciertas células tumoral [105].

Con la finalidad de evaluar el papel de PI3K durante la activación de las células NK, cuando se involucra el entrecruzamiento de SLAMF7, el siguiente objetivo fue inhibir la actividad enzimática de PI3K. Similar a trabajos ya publicados, nuestros resultados también mostraron que la capacidad citotóxica de las células NK se redujo de manera general, no obstante, cuando se involucraron las señales a través de SLAMF7 durante esta vía de activación, se logró rescatar de manera significativa la capacidad citolítica y de degranulación de las células NK con respecto a la condición donde no se involucró el entrecruzamiento de SLAMF7. Por un lado, estos resultados concuerdan con los trabajos ya publicados donde se demuestra que la inhibición de PI3K reduce la capacidad citotóxica de las células NK. Por otro lado, nuestros resultados muestran que aun inhibiendo a PI3K, SLAMF7 sigue incrementando la capacidad citotóxica de las células NK. Por lo tanto, aunque la inhibición de PI3K impacta durante la activación de las células NK, se sugiere que SLAMF7 incrementa la capacidad citotóxica de las células NK a través de una vía que puede ser independiente de PI3K.

Diferentes trabajos han propuesto, por un lado, que cada uno de los receptores de activación en las células NK son capaz de regular eventos específicos, y por otro lado, que una respuesta citotóxica eficiente únicamente es posible cuando se involucra la estimulación de al menos dos receptores de activación distintos, en ese contexto, la función citotóxica de estas células ocurre a través de eventos sinérgicos, donde un receptor de activación o puede regular adhesión o polarización o pueden regular degranulación (pero al parecer, no todos los eventos) [65], [68]. Por lo tanto, nuestros resultados también coinciden con esos

antecedentes. En este trabajo analizamos el papel de SLAMF7 en las células NK humanas y demostramos por primera vez como es que este receptor promueve su activación. Demostramos que el ligando natural de SLAMF7 incrementó la capacidad citotóxica de las células NK a través de incidir específicamente en la degranulación celular, asimismo, también demostramos que este efecto ocurrió a través de una vía dependiente de PLC- γ , y con menor impacto de PI3K. Adicionalmente, también se encontró que SLAMF7 no impactó ni durante la adhesión ni durante la polarización celular. En conclusión, generamos evidencia convincente donde se demuestra que SLAMF7 es un receptor de activación que incrementa la síntesis de citocinas y la capacidad citolítica en células NK humanas. Considerablemente, SLAMF7 se expresa de manera abundante en diferentes patologías de origen hematopoyético, por lo que nuestros resultados podrían contribuir aún más a la generación de nuevas estrategias terapéuticas para el control de ciertas enfermedades como el mieloma multiple, linfomas o leucemias.

Resumen Gráfico

Activación de células NK

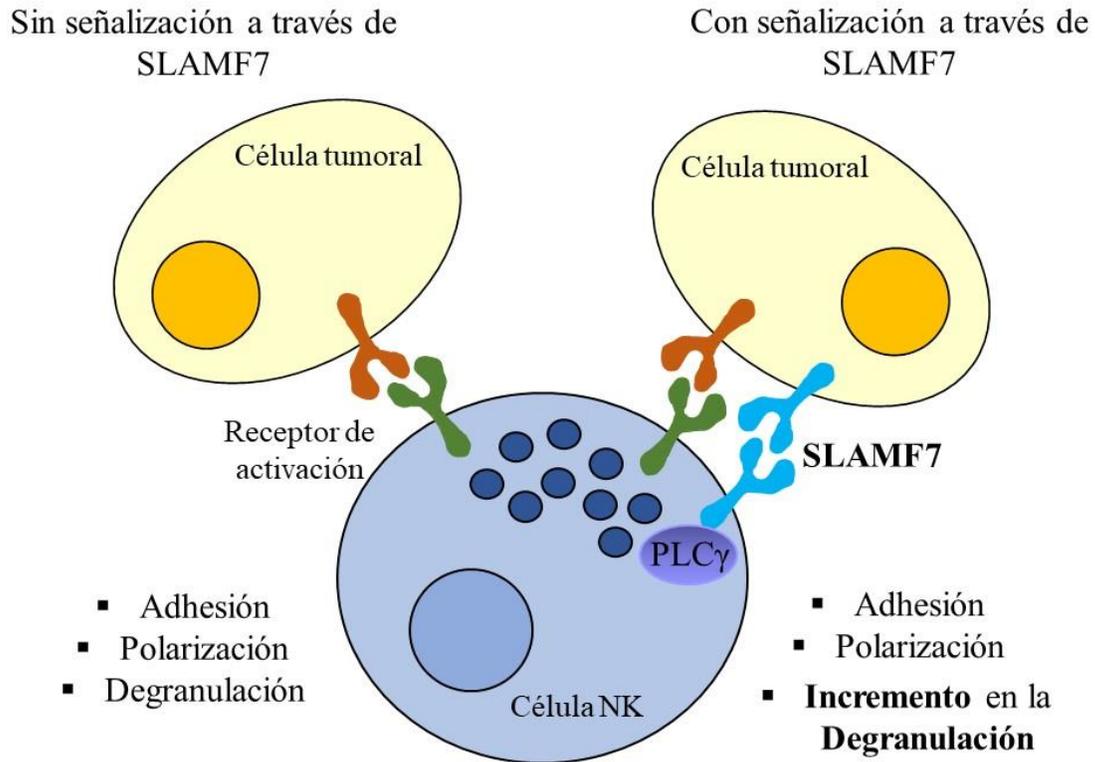


Figura 22. Modelo hipotético a través del cual SLAMF7 regula la capacidad citotóxica de las células NK humanas. La función citotóxica de las células NK se regula a través de un balance de señales entre receptores de inhibición y receptores de activación presentes en la membrana celular externa de las células NK. Cuando las señales de activación dominan, con respecto a las señales de inhibición, se promueve la función citotóxica de las células NK. En este trabajo demostramos que cuando se involucra el entrecruzamiento de SLAMF7 durante la activación de las células NK, se promueve una mayor capacidad citotóxica en las células NK a través de incidir específicamente en la degranulación celular, además, este efecto resultó ser dependiente de la proteína PLC- γ .

Perspectivas

Futuros trabajos deberían enfocarse en determinar el papel de EAT-2 y la importancia de su tirosina localizada en la posición 127 durante la vía de activación de SLAMF7 en células NK humanas. Además, evaluar el impacto de la tirosina 284 y de la tirosina 304 del dominio citoplasmático de SLAMF7 permitiría elucidar el mecanismo molecular de este receptor en células NK humanas.

Por otro lado, resulta esencial evaluar el papel de SLAMF7 en células humanas que no expresan EAT-2, en especial en los linfocitos T citotóxicos, por lo que implementar un modelo celular bajo este escenario permitirá desarrollar nuevo conocimiento acerca del papel que cumple SLAMF7 en células citotóxicas humanas que carecen de la presencia de EAT-2.

Referencias

- [1] R. V. Uzhachenko and A. Shanker, “CD8+ T lymphocyte and NK cell network: Circuitry in the cytotoxic domain of immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. AUG, pp. 1–7, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01906.
- [2] L. Quatrini, M. Della Chiesa, S. Sivori, M. C. Mingari, D. Pende, and L. Moretta, “Human NK cells, their receptors and function,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 51, no. 7, pp. 1566–1579, Jul. 2021, doi: 10.1002/EJI.202049028.
- [3] J. C. Sun and L. L. Lanier, “NK cell development, homeostasis and function: Parallels with CD8 + T cells,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 10, pp. 645–657, 2011, doi: 10.1038/nri3044.
- [4] A. M. Abel, C. Yang, M. S. Thakar, and S. Malarkannan, “Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. AUG, pp. 1–23, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- [5] A. G. Freud, B. L. Mundy-Bosse, J. Yu, and M. A. Caligiuri, “The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity,” *Immunity*, vol. 47, no. 5, pp. 820–833, 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.
- [6] M. A. Cooper, T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri, “NK cell and DC interactions,” *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 47–52, 2004, doi: 10.1016/j.it.2003.10.012.
- [7] G. Ferlazzo and B. Morandi, “Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. APR, p. 159, 2014, doi: 10.3389/FIMMU.2014.00159.
- [8] R. B. Herberman, “A historical introduction of natural killer (NK) cells and current status of their role in host defences,” *NeuroImmune Biol.*, vol. 5, no. C, pp. 81–94, 2005, doi: 10.1016/S1567-7443(05)80010-9.
- [9] M. Vitale *et al.*, “An historical overview: The discovery of how NK cells can kill enemies, recruit defense troops, and more,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JUN, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01415.
- [10] G. M. Konjević, A. M. Vuletić, K. M. Mirjačić Martinović, A. K. Larsen, and V. B. Jurišić, “The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment,” *Cytokine*, vol. 117, no. August 2018, pp. 30–40, 2019, doi: 10.1016/j.cyto.2019.02.001.
- [11] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, “Functions of natural killer cells,” vol. 9, no. 5, pp. 503–510, 2008, doi: 10.1038/ni1582.
- [12] B. Tesi, H. Schlums, F. Cichocki, and Y. T. Bryceson, “Epigenetic Regulation of Adaptive NK Cell Diversification,” *Trends Immunol.*, vol. 37, no. 7, pp. 451–461, 2016, doi: 10.1016/j.it.2016.04.006.
- [13] H. Schlums *et al.*, “Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function,” *Immunity*,

vol. 42, no. 3, pp. 443–456, 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.008.

- [14] M. A. Cooper, T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri, “The biology of human natural killer-cell subsets,” *Trends in Immunology*, vol. 22, no. 11. Elsevier Current Trends, pp. 633–640, Nov. 01, 2001, doi: 10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
- [15] A. Poli, T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, and J. Zimmer, “CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset,” *Immunology*, vol. 126, no. 4, pp. 458–465, Apr. 2009, doi: 10.1111/J.1365-2567.2008.03027.X.
- [16] A. Chan *et al.*, “CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 1, pp. 89–94, Jul. 2007, doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.1.89.
- [17] M. Amand *et al.*, “Human CD56dimCD16dim Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. JUN, p. 699, Jun. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.00699.
- [18] I. Prager and C. Watzl, “Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 105, no. 6, pp. 1319–1329, Jun. 2019, doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R.
- [19] J. S. Orange, “Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 713–725, 2008, doi: 10.1038/nri2381.
- [20] A. Kabanova, V. Zurli, and C. T. Baldari, “Signals Controlling Lytic Granule Polarization at the Cytotoxic Immune Synapse,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. FEB, p. 307, Feb. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00307.
- [21] H. HT *et al.*, “NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing,” *J. Cell Biol.*, vol. 215, no. 6, pp. 875–889, 2016, doi: 10.1083/JCB.201604136.
- [22] A. N. Mentlik, K. B. Sanborn, E. L. Holzbaur, and J. S. Orange, “Rapid Lytic Granule Convergence to the MTOC in Natural Killer Cells Is Dependent on Dynein But Not Cytolytic Commitment,” <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-11-0930>, vol. 21, no. 13, pp. 2241–2256, May 2010, doi: 10.1091/MBC.E09-11-0930.
- [23] J. Lieberman, “The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 5, pp. 361–370, 2003, doi: 10.1038/nri1083.
- [24] L. T. Joeckel and P. I. Bird, “Are all granzymes cytotoxic in vivo?,” *Biol. Chem.*, vol. 395, no. 2, pp. 181–202, Feb. 2014, doi: 10.1515/HSZ-2013-0238.
- [25] M. Barry and R. C. Bleackley, “Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 6, pp. 401–409, 2002, doi: 10.1038/nri819.
- [26] S. Paul and G. Lal, “The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. SEP, p. 1124, Sep. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.01124.
- [27] A. J. Brennan, J. Chia, J. A. Trapani, and I. Voskoboinik, “Perforin deficiency and susceptibility to cancer,” *Cell Death Differ.* 2010 174, vol. 17, no. 4, pp. 607–615,

Jan. 2010, doi: 10.1038/cdd.2009.212.

- [28] I. Voskoboinik, J. C. Whisstock, and J. A. Trapani, “Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology,” *Nat. Rev. Immunol.* 2015 156, vol. 15, no. 6, pp. 388–400, May 2015, doi: 10.1038/NRI3839.
- [29] T. L. Geiger and J. C. Sun, “Development and maturation of natural killer cells,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 39, pp. 82–89, 2016, doi: 10.1016/j.coi.2016.01.007.
- [30] M. G. Netea *et al.*, “Defining trained immunity and its role in health and disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 6, pp. 375–388, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0285-6.
- [31] S. Kim *et al.*, “Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules,” *Nature*, vol. 436, no. 7051, pp. 709–713, 2005, doi: 10.1038/nature03847.
- [32] D. H. Raulet and R. E. Vance, “Self-tolerance of natural killer cells,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 520–531, Jul. 2006, doi: 10.1038/nri1863.
- [33] J. D. Coudert, L. Scarpellino, F. Gros, E. Vivier, and W. Held, “Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways,” *Blood*, vol. 111, no. 7, pp. 3571–3578, Apr. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-07-100057.
- [34] J. C. Sun and L. L. Lanier, “Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development,” *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 8, pp. 1819–1828, Aug. 2008, doi: 10.1084/jem.20072448.
- [35] E. Narni-Mancinelli *et al.*, “Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses,” *Science (80-.)*, vol. 335, no. 6066, pp. 344–348, Jan. 2012, doi: 10.1126/science.1215621.
- [36] S. Johansson *et al.*, “Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules,” *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 7, pp. 1145–1155, Apr. 2005, doi: 10.1084/JEM.20050167.
- [37] Y. He and Z. Tian, “NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 321–330, 2017, doi: 10.1038/cmi.2016.26.
- [38] K. Lagrue, A. Carisey, D. J. Morgan, R. Chopra, and D. M. Davis, “Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds,” *Blood*, vol. 126, no. 1, pp. 50–60, Jul. 2015, doi: 10.1182/BLOOD-2015-01-625004.
- [39] U. Hadad, T. J. Thauland, O. M. Martinez, M. J. Butte, A. Porgador, and S. M. Krams, “NKp46 Clusters at the Immune Synapse and Regulates NK Cell Polarization,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. SEP, p. 495, 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00495.
- [40] S. Guia *et al.*, “Confinement of activating receptors at the plasma membrane controls

natural killer cell tolerance,” *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 167, Apr. 2011, doi: 10.1126/scisignal.2001608.

- [41] N. Anfossi *et al.*, “Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I,” *Immunity*, vol. 25, no. 2, pp. 331–342, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.013.
- [42] J. E. Boudreau and K. C. Hsu, “Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned,” *Trends Immunol.*, vol. 39, no. 3, pp. 222–239, 2018, doi: 10.1016/j.it.2017.12.001.
- [43] M. D. Bern *et al.*, “Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif–dependent functions of an MHC class I-specific NK cell receptor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 40, pp. E8440–E8447, Oct. 2017, doi: 10.1073/pnas.1713064114.
- [44] S. Chen *et al.*, “The Self-Specific Activation Receptor SLAM Family Is Critical for NK Cell Education,” *Immunity*, vol. 45, no. 2, pp. 292–304, 2016, doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.013.
- [45] E. Vivier, S. Ugolini, D. Blaise, C. Chabannon, and L. Brossay, “Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 239–252, 2012, doi: 10.1038/nri3174.
- [46] H. J. Pegram, D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy, and M. H. Kershaw, “Activating and inhibitory receptors of natural killer cells,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 89, no. 2, pp. 216–224, 2011, doi: 10.1038/icb.2010.78.
- [47] L. G. M. Guzman, N. Keating, and S. E. Nicholson, “Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling,” *Cancers 2020, Vol. 12, Page 952*, vol. 12, no. 4, p. 952, Apr. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12040952.
- [48] Y. T. Bryceson *et al.*, “Molecular mechanisms of natural killer cell activation,” *J. Innate Immun.*, vol. 3, no. 3, pp. 216–226, 2011, doi: 10.1159/000325265.
- [49] L. C. Sullivan *et al.*, “The Heterodimeric Assembly of the CD94-NKG2 Receptor Family and Implications for Human Leukocyte Antigen-E Recognition,” *Immunity*, vol. 27, no. 6, pp. 900–911, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2007.10.013.
- [50] J. Zhang *et al.*, “Leukocyte immunoglobulin-like receptors in human diseases: an overview of their distribution, function, and potential application for immunotherapies,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 102, no. 2, pp. 351–360, Aug. 2017, doi: 10.1189/jlb.5mr1216-534r.
- [51] X. Kang *et al.*, “Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors,” *Cell Cycle*, vol. 15, no. 1, pp. 25–40, 2016, doi: 10.1080/15384101.2015.1121324.
- [52] S. M. Henson and A. N. Akbar, “KLRG1-more than a marker for T cell senescence,” doi: 10.1007/s11357-009-9100-9.
- [53] M. Ito, T. Maruyama, N. Saito, S. Koganei, K. Yamamoto, and N. Matsumoto, “Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin

- family to inhibit NK cell cytotoxicity,” *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 2, pp. 289–295, Feb. 2006, doi: 10.1084/jem.20051986.
- [54] C. Watzl and E. O. Long, “Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells,” *Curr. Protoc. Immunol.*, no. August, pp. 1–17, 2010, doi: 10.1002/0471142735.im1109bs90.
- [55] M. E. Peterson and E. O. Long, “Inhibitory Receptor Signaling via Tyrosine Phosphorylation of the Adaptor Crk,” *Immunity*, vol. 29, no. 4, pp. 578–588, 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.014.
- [56] M.-C. Yu *et al.*, “An essential function for β -arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells,” *Nat. Immunol.* 2008 98, vol. 9, no. 8, pp. 898–907, Jul. 2008, doi: 10.1038/ni.1635.
- [57] A. Ben-Shmuel, B. Sabag, G. Biber, and M. Barda-Saad, “The Role of the Cytoskeleton in Regulating the Natural Killer Cell Immune Response in Health and Disease: From Signaling Dynamics to Function,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. February, pp. 1–26, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.609532.
- [58] J. L. Cannons, S. G. Tangye, and P. L. Schwartzberg, “SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, no. 1, pp. 665–705, Apr. 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- [59] N. Wu and A. Veillette, “SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 38, pp. 45–51, 2016, doi: 10.1016/j.coi.2015.11.003.
- [60] T. J. Wilson, L. I. Garner, C. Metcalfe, E. King, S. Margraf, and M. H. Brown, “Fine specificity and molecular competition in SLAM family receptor signalling,” *PLoS One*, vol. 9, no. 3, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092184.
- [61] A. D. Barrow, C. J. Martin, and M. Colonna, “The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease,” *Front. Immunol.*, vol. 0, no. MAY, p. 909, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00909.
- [62] C. Bottino *et al.*, “Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 4, pp. 557–567, Aug. 2003, doi: 10.1084/jem.20030788.
- [63] D. Urlaub, K. Höfer, M.-L. Müller, and C. Watzl, “LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 5, pp. 1944–1951, 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1601004.
- [64] J. Koch, A. Steinle, C. Watzl, and O. Mandelboim, “Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection,” *Trends Immunol.*, vol. 34, no. 4, pp. 182–191, 2013, doi: 10.1016/j.it.2013.01.003.
- [65] Y. T. Bryceson, M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long, “Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells,” *Immunol. Rev.*, vol. 214, no. 1, pp. 73–91, 2006, doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x.

- [66] H.-J. Kwon and H. S. Kim, “Signaling for Synergistic Activation of Natural Killer Cells,” *Immune Netw.*, vol. 12, no. 6, p. 240, 2012, doi: 10.4110/in.2012.12.6.240.
- [67] H. S. Kim and E. O. Long, “Complementary phosphorylation sites in the adaptor protein SLP-76 promote synergistic activation of natural killer cells,” *Sci. Signal.*, vol. 5, no. 232, 2012, doi: 10.1126/scisignal.2002754.
- [68] Y. T. Bryceson, M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long, “Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural,” *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 159–166, 2006, doi: 10.1182/blood-2005-04-1351.Supported.
- [69] F. M. Wensveen, V. Jelenčić, and B. Polić, “NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAR, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00441.
- [70] Z. Zhang, N. Wu, Y. Lu, D. Davidson, M. Colonna, and A. Veillette, “DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif,” *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 12, pp. 2165–2182, Nov. 2015, doi: 10.1084/jem.20150792.
- [71] W. C. Dougall, S. Kurtulus, M. J. Smyth, and A. C. Anderson, “TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy,” *Immunol. Rev.*, vol. 276, no. 1, pp. 112–120, Mar. 2017, doi: 10.1111/IMR.12518.
- [72] J. M. Cantor, M. H. Ginsberg, and D. M. Rose, “Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets,” *Immunol. Rev.*, vol. 223, no. 1, pp. 236–251, Jun. 2008, doi: 10.1111/J.1600-065X.2008.00640.X.
- [73] Z. Dong, M. E. Cruz-Munoz, M. C. Zhong, R. Chen, S. Latour, and A. Veillette, “Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 973–980, 2009, doi: 10.1038/ni.1763.
- [74] H. Nakajima *et al.*, “Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 11, pp. 3309–3318, 2000, doi: 10.1002/1521-4141(200011)30:11<3309::AID-IMMU3309>3.0.CO;2-3.
- [75] N. Wu *et al.*, “A hematopoietic cell-driven mechanism involving SLAMF6 receptor, SAP adaptors and SHP-1 phosphatase regulates NK cell education,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 387–396, 2016, doi: 10.1038/ni.3369.
- [76] J. L. Cannons, S. G. Tangye, and P. L. Schwartzberg, “SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, no. 1, pp. 665–705, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- [77] L. A. Pérez-Quintero, R. Roncagalli, H. Guo, S. Latour, D. Davidson, and A. Veillette, “EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase C γ , Ca $^{++}$, and Erk, leading to granule polarization,” *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 4, pp. 727–742, 2014, doi: 10.1084/jem.20132038.
- [78] Z. Dong, D. Davidson, L. A. Pérez-Quintero, T. Kurosaki, W. Swat, and A. Veillette, “The Adaptor SAP Controls NK Cell Activation by Regulating the

- Enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by Enhancing Conjugates with Target Cells,” *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 974–985, 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.023.
- [79] P. Engel, M. J. Eck, and C. Terhorst, “The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 813–821, 2003, doi: 10.1038/nri1202.
- [80] A. Veillette, L. A. Pérez-Quintero, and S. Latour, “X-linked lymphoproliferative syndromes and related autosomal recessive disorders,” *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 614–622, 2013, doi: 10.1097/ACI.0000000000000008.
- [81] M. E. Cruz-Munoz, Z. Dong, X. Shi, S. Zhang, and A. Veillette, “Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 297–305, 2009, doi: 10.1038/ni.1693.
- [82] H. Guo, M.-E. Cruz-Munoz, N. Wu, M. Robbins, and A. Veillette, “Immune Cell Inhibition by SLAMF7 Is Mediated by a Mechanism Requiring Src Kinases, CD45, and SHIP-1 That Is Defective in Multiple Myeloma Cells,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 1, pp. 41–51, Jan. 2015, doi: 10.1128/mcb.01107-14.
- [83] I. Tassi and M. Colonna, “The Cytotoxicity Receptor CRACC (CS-1) Recruits EAT-2 and Activates the PI3K and Phospholipase C γ Signaling Pathways in Human NK Cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 12, pp. 7996–8002, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.12.7996.
- [84] A. Bouchon, M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna, “Cutting Edge: Activation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by a SAP-Independent Receptor of the CD2 Family,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 10, pp. 5517–5521, 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5517.
- [85] S. Stark and C. Watzl, “2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells,” *Int. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 241–247, 2006, doi: 10.1093/intimm/dxh358.
- [86] K. S. Campbell, A. D. Cohen, and T. Pazina, “Mechanisms of NK Cell Activation and Clinical Activity of the Therapeutic SLAMF7 Antibody, Elotuzumab in Multiple Myeloma,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. NOV, p. 2551, Nov. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02551.
- [87] A. Veillette, Z. Dong, L. A. Pérez-Quintero, M. C. Zhong, and M. E. Cruz-Munoz, “Importance and mechanism of switch function of SAP family adaptors,” *Immunol. Rev.*, vol. 232, no. 1, pp. 229–239, 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00824.x.
- [88] A. Veillette, “Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors,” *Nat. Rev. Immunol.* 2006 61, vol. 6, no. 1, pp. 56–66, Jan. 2006, doi: 10.1038/nri1761.
- [89] D. Comte, M. P. Karampetsou, N. Yoshida, K. Kis-Toth, V. C. Kyttaris, and G. C. Tsokos, “Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8⁺ T Cell Function in Systemic Lupus

- Erythematosus,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 69, no. 5, pp. 1035–1044, May 2017, doi: 10.1002/art.40038.
- [90] J. K. Lee, S. O. Mathew, S. V. Vaidya, P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew, “CS1 (CRACC, CD319) Induces Proliferation and Autocrine Cytokine Expression on Human B Lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 7, pp. 4672–4678, 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4672.
- [91] J. Chen *et al.*, “SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin,” *Nature*, vol. 544, no. 7651, pp. 493–497, 2017, doi: 10.1038/nature22076.
- [92] C. Watzl and E. O. Long, “Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells,” in *Current Protocols in Immunology*, vol. 0 11, John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [93] E. O. Long, H. Sik Kim, D. Liu, M. E. Peterson, and S. Rajagopalan, “Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. 1, pp. 227–258, 2013, doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005.
- [94] P. Höglund and P. Brodin, “Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 10, pp. 724–734, 2010, doi: 10.1038/nri2835.
- [95] C. W. McMahon and D. H. Raulet, “Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 465–470, Aug. 2001, doi: 10.1016/S0952-7915(00)00242-9.
- [96] M. P. Karampetsou, D. Comte, K. Kis-Toth, V. C. Kyttaris, and G. C. Tsokos, “Expression patterns of signaling lymphocytic activation molecule family members in peripheral blood mononuclear cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus,” 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0186073.
- [97] J. L. Cannons *et al.*, “Optimal Germinal Center Responses Require a Multistage T Cell:B Cell Adhesion Process Involving Integrins, SLAM-Associated Protein, and CD84,” *Immunity*, vol. 32, no. 2, pp. 253–265, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2010.01.010/ATTACHMENT/30A02D37-CB70-4F30-8E76-FDF337CFA40E/MMC2.MOV.
- [98] H. Qi, J. L. Cannons, F. Klauschen, P. L. Schwartzberg, and R. N. Germain, “SAP-controlled T–B cell interactions underlie germinal centre formation,” *Nat. 2008 4557214*, vol. 455, no. 7214, pp. 764–769, Oct. 2008, doi: 10.1038/nature07345.
- [99] G. Alter, J. M. Malenfant, and M. Altfeld, “CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity,” *J. Immunol. Methods*, vol. 294, no. 1–2, pp. 15–22, 2004, doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008.
- [100] P. Aichele *et al.*, “Natural killer cell protocols: cellular and molecular methods,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 612, no. July, p. 550, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-362-6.

- [101] A. Caraux *et al.*, “Phospholipase C-2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells,” 2006, doi: 10.1182/blood-2005-06-2428.
- [102] E. M. Mace, “Phosphoinositide-3-kinase signaling in human natural killer cells: New insights from primary immunodeficiency,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAR, p. 445, Mar. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00445/BIBTEX.
- [103] K. Jiang *et al.*, “Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells,” *Nat. Immunol.* 2000 15, vol. 1, no. 5, pp. 419–425, 2000, doi: 10.1038/80859.
- [104] S. S. Yea *et al.*, “Effects of Novel Isoform-Selective Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitors on Natural Killer Cell Function,” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e99486, Jun. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0099486.
- [105] N. Kim *et al.*, “The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion,” *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3202–3208, Nov. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2007-02-075366.



Research Article

SLAMF7 selectively favors degranulation to promote cytotoxicity in human NK cells

Arturo Gutierrez-Guerrero^{1,2}, Ismael Mancilla-Herrera³,
Jose L. Maravillas-Montero^{4,5} , Ivan Martínez-Duncker⁶, Andre Veillette⁷
and Mario E. Cruz-Munoz¹

¹ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

² Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Mexico City, México

³ Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City, México

⁴ Red de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

⁵ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México

⁶ Centro de Investigación en Dinámica celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

⁷ Institute de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada

NK cells play an important role in immunity by recognizing and eliminating cells undergoing infection or malignant transformation. This role is dependent on the ability of NK cells to lyse targets cells in a perforin-dependent mechanism and by secreting inflammatory cytokines. Both effector functions are controlled by several cell surface receptors. The Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) family of receptors plays an essential role in regulating NK cell activation. Several studies have demonstrated that SLAMF7 regulates NK cell activation. However, the molecular and cellular mechanisms by which SLAMF7 influences NK effector functions are unknown. Here, we present evidence that physiological ligation of SLAMF7 in human NK cells enhances the lysis of target cells expressing SLAMF7. This effect was dependent on the ability of SLAMF7 to promote NK cell degranulation rather than cytotoxic granule polarization or cell adhesion. Moreover, SLAMF7-dependent NK cell degranulation was predominantly dependent on PLC- γ when compared to PI3K. These data provide novel information on the cellular mechanism by which SLAMF7 regulates human NK cell activation. Finally, this study supports a model for NK cell activation where activated receptors contribute by regulating specific discrete cellular events rather than multiple cellular processes.

Keywords: cell signaling · lymphocyte activation · NK cells · SLAM receptors · SLAMF7



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Correspondence: Mario E. Cruz-Munoz
e-mail: mario.cruz@uasem.mx

© 2021 Wiley-VCH GmbH

www.eji-journal.eu

Introduction

NK cells play an important role in normal immunity by recognizing and eliminating cells undergoing infection or malignant transformation. In addition, NK cells are able to influence the function of other immune cells by secreting inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . As a consequence of these two effector functions, NK cells are crucial for both, immune surveillance and immune regulation [1]. In contrast to T or B cells, where the antigen receptor guides activation, NK cells do not have a single receptor able to mediate all effector functions by itself. Instead, NK cells display an array of cell surface receptors which must cooperate synergistically in order to efficiently activate NK cell effector functions [2]. An exception to this scenario is CD16, the low-affinity receptor for IgG, for which ligation is sufficient to promote antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

NK cells deliver their cytotoxic and regulatory elements through a series of coordinated events which are regulated by different receptors and signaling proteins [2,3]. Cell adhesion plays a central role by allowing NK cells to secure stable contacts with target cells, leading to further cellular events. In resting NK cells, signals resulting from LFA-1 engagement by IACM-1 are sufficient to mediate NK cell adhesion [4]. In addition to LFA-1, the coligation of CD16 and 2B4 has also been shown to provide signals that regulate NK cell adhesion. In contrast, independent ligation of CD16 or 2B4 does not induce NK cell adhesion [4, 5]. This adhesion step is followed by a stepwise movement of lytic granules to the microtubule-organizing center (MTOC), which then guides lytic granules towards the contact site of the target cell [6–8]. The highly organized movement of lytic granules along cytoskeleton elements has been described as granule polarization. Once lytic granules have been positioned beneath the plasma membrane, their content is released into a well-defined secretory cleft formed at the interface with the target cell, a cellular event defined as degranulation or exocytosis of lytic granules [9]. Both, lytic granule polarization and degranulation are regulated by different systems of receptors-ligand pairs [2]. In resting NK cells, the single ligation of LFA-1 by IACM-1 has been also shown to provide signals that direct lytic granule polarization [4]. In addition, concomitant signals provided by CD16 and 2B4 were also able to prompt lytic granule polarization in primary NK cells [3]. A role for CD28 in mediating MTOC and lytic granule polarization has been also described in a NK cell line [10]. In contrast, to adhesion and granule polarization, LFA-1 does not have any impact on NK cell degranulation. Instead, the ligation of CD16 seems to be enough to promote NK cell degranulation [4]. As for NK cell adhesion, 2B4 and NKG2D may cooperate synergistically to sustain NK cell degranulation. A conclusion from all these studies is that no single receptor is sufficient to sustain all series of cellular events required to fulfill NK cell activation. NK cell activation is rather the result of coordinated participation of multiple receptors, where a particular receptor influences only some of the multiple discrete events that are necessary to achieve an efficient NK cell-mediated cytotoxicity.

Among receptors to play an essential role in regulating NK cell activation, there are those grouped in the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of receptors [11, 12]. This family belongs to the Ig superfamily and is composed by 7 members named SLAM (SLAMP1, CD150), CD48 (SLAMP2), Ly9 (SLAMP3, CD2299), 2B4 (SLAMP4, CD244), CD84 (SLAMP5), NTBA (SLAMP6, CD352), or SLAMP7 (CRACC, CD319). Apart from 2B4, which recognizes CD48 as a ligand, all members of this family are self-ligands and participate in the context of heterotypic or homotypic cell-to-cell interactions. All members of the SLAM family harbor in their cytoplasmic domain at least one tyrosine-based motif named Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif (ITSM). This motif plays an essential role in determining the signals that are delivered downstream of the cytoplasmic tail of SLAM receptors [11]. Following tyrosine phosphorylation by Src family kinases, the tyrosine residues within ITSM motifs act as docking sites for members of the SLAM-associated protein (SAP) family and other SH2 domain-containing signaling proteins [13, 14]. Complementary mechanisms have been proposed to explain how SAP family adaptors regulate cell signaling through SLAM family receptors. The binding of SAP adaptors to the ITSM domains, located within the cytoplasmic domain of SLAM receptors, has been shown to sterically interfere with the binding of SH2 domain-containing phosphatases including SHP-1 and SHIP1 [15, 16]. In addition to this role as a natural blocking protein, SAP is able to associate with Fyn, promoting tyrosine phosphorylation events downstream SLAM receptors [17–20]. These SLAM receptor-mediated signaling mechanisms have been shown to play a central role in the regulation of T lymphocytes and NK cell functions. In NK cells, engagement of SLAM receptors results in NK cell activation leading to enhanced natural cytotoxicity and cytokine secretion [21–25]. Further studies have shown that these effects were partly dependent on regulating inside-out signaling through LFA-1 or by enhancing granule polarization [23, 26].

From all members of the SLAM family, SLAMP7 is the only receptor that is not suitable for SAP binding [22, 27]. Instead, SLAMP7 is able to bind Ewings' sarcoma-associated transcript 2 (EAT-2) through an ITSM-like domain located in the cytoplasmic domain [22, 28]. In mouse NK cells, SLAMP7 has been shown to influence NK cell function by either activating or inhibiting NK cell-mediated cytotoxicity [22]. The dual role of SLAMP7 in NK cells is determined by the presence or absence of EAT-2. When EAT-2 is expressed in NK cells, SLAMP7 is able to promote activating signals whereas, in the absence of the adaptor, SLAMP7 delivers inhibitory signals. Interestingly, both activating and inhibitory signals depend on two different tyrosine residues located in the cytoplasmic domain of SLAMP7. In human NK cells, SLAMP7 promotes NK-mediated cytotoxicity in reverse ADCC assays [27, 28]. Antibody-dependent SLAMP7 crosslinking resulted in an association of SLAMP7 with EAT-2, which favored SLAMP7 tyrosine phosphorylation, an event that was partially reduced by Src-inhibitors. In addition, the association between SLAMP7 and EAT-2 also promoted tyrosine phosphorylation of PLC- γ and PI3K, two major regulators of NK cell activation. The

studies suggest that EAT-2 plays an essential role in mediating SLAMF7-dependent signaling. The critical role of EAT-2 allowing SLAMF7 downstream signaling, was confirmed in human NK cells from patients lacking SAP but not EAT-2 expression, where the enhanced SLAMF7-mediated NK cell cytotoxicity was preserved [27]. Moreover, SLAMF7 expression in the human epithelial cell 293T, also led to enhanced SLAMF7-mediated cytotoxicity [25]. All these studies have demonstrated that SLAMF7 is a receptor that regulates NK cell activation. Despite these notorious findings, it is not clear what are the molecular and cellular mechanisms by which SLAMF7 influences NK effector functions.

In this work, we present evidence that physiological ligation of SLAMF7 in human NK cells enhances the lysis of target cells expressing SLAMF7. This effect was mostly dependent on the ability of SLAMF7 to promote NK cell degranulation rather than cytotoxic granule polarization or cell adhesion. Moreover, the SLAMF7-promoted NK cell degranulation was predominantly dependent on PLC- γ when compared to PI3K. These data provide novel information on the cellular mechanism by which SLAMF7 regulates human NK cell activation. Finally, this study also supports a model for NK cell activation where activating receptors contribute by regulating discrete cellular events rather than global cellular processes.

Results

SLAMF7 expression in human NK cells is regulated by different cytokines

SLAMF7 is expressed in both, human and mouse resting NK cells, however little is known on how SLAMF7 expression is regulated in response to different stimuli. Cytokines have been shown to affect NK cell activation by either enhancing or inhibiting NK cell effector functions. Therefore, we evaluated SLAMF7 expression in resting human NK cells treated with different cytokines that influence NK cell activation. As shown in Supporting Information Fig. 1A and C, resting NK cells expressed SLAMF7 at basal levels (about 20%). After 2 days of stimulation with IL-2 or IL-12 plus IL-15, a significant increase in the percentage of NK cells expressing SLAMF7 was observed (55% and 88%, respectively). In contrast, no significant difference was observed in the percentage of NK cells expressing SLAMF7 when cells were treated with IFN- β (1.3%) or TGF- β (7%). The percentage of NK cells expressing SLAMF7 after 5 days of treatment with cytokines was similar compared to that observed after 2 days (Supplementary Fig. 1B and C). In addition, an upregulation in the expression of SLAMF7 was observed in response to IL-2 and IL-12 plus IL-15, but not in response to IFN- β nor TGF- β (Supporting Information Fig. 1A-C). Although, an increase in the SLAM expression was observed after 2 and 5 days of stimulation, only significant differences were observed at 48 hrs. These data suggest that SLAMF7 expression is influenced by cytokines that regulate NK cell activation.

SLAMF7 ligation in NK cells promotes lysis of target cells expressing SLAMF7

In mouse NK cells, ectopic expression of SLAMF7 in sensitive target cells enhanced lysis by IL-2-activated NK cells [21, 22]. In addition, expression of SLAMF7 in BaF3 or in the human cell line 293T also induced human NK cell activation [25]. However, these studies were performed using IL-2 expanded human NK cells or MHC class-I negative target cells (293T cells). In order to use target cells distinct from those used in previous studies, we analyzed the expression of SLAMF7 in various hematopoietic human cells susceptible to be lysed by human NK cells (Supporting Information Fig. 2). Since all tested cells were positive for SLAMF7 expression, we evaluated the SLAMF7 expression in human non-hematopoietic cells. As expected, expression of SLAMF7 or other members of the SLAM family was not detected in various of these cells (data not shown). From all non-hematopoietic cells tested, HeLa cells have been shown to be susceptible to human NK cell lysis, and unlike 293T cells, they express MHC class I molecules [29]. Therefore, based on the lack of SLAMF7 expression and positivity for MHC class I molecules, we chose HeLa cells as targets to evaluate NK cell effector functions. The absence of SLAMF7 expression in HeLa cells was confirmed by PCR analysis (Supporting Information Fig. 3A). We transduced HeLa cells with retrovirus encoding GFP alone or in combination with human SLAMF7 (Supporting Information Fig. 3B). As source of effector cells, we used primary NK cells from peripheral blood and the SLAMF7-positive human NK cell line NK-92. As shown in Fig. 1A, expression of SLAMF7 on HeLa cells enhanced cytolytic activity of primary NK cells and NK-92 cells. Moreover, we observed that SLAMF7 expression in HeLa cells also upregulated the TNF- α and IFN- γ production in IL-2-treated primary NK cells, but not in primary resting NK cells (Fig. 1B). Finally, a significant increase in the production of TNF- α was also observed in the NK cell line NK-92 upon SLAMF7 self-ligation (Supporting Information Fig. 4). Therefore, as in mouse NK cells, SLAMF7 self-ligation led to enhance human NK cell-mediated effector functions.

SLAMF7 does not regulate NK cell adhesion

In order to achieve effector functions toward sensitive target cells, a series of stepwise discrete events must occur in NK cells [30]. Such cellular events encompass cell adhesion, granule polarization, degranulation, or lytic granule exocytosis [9, 30, 31]. In order to determine the cellular mechanism by which SLAMF7 enhances NK cell activation, we assessed the impact of SLAMF7 on regulating NK cell adhesion to HeLa cells expressing or not SLAMF7. Thus, we compared the ability of NK cells to form cells conjugates with HeLa cells expressing or lacking SLAMF7 expression. As shown in Fig. 2A, the percentage of NK cells forming conjugates with HeLa cells lacking SLAMF7 expression increased over time reaching a maximum value at 20 min. No significant differences were found in the ability of NK cells

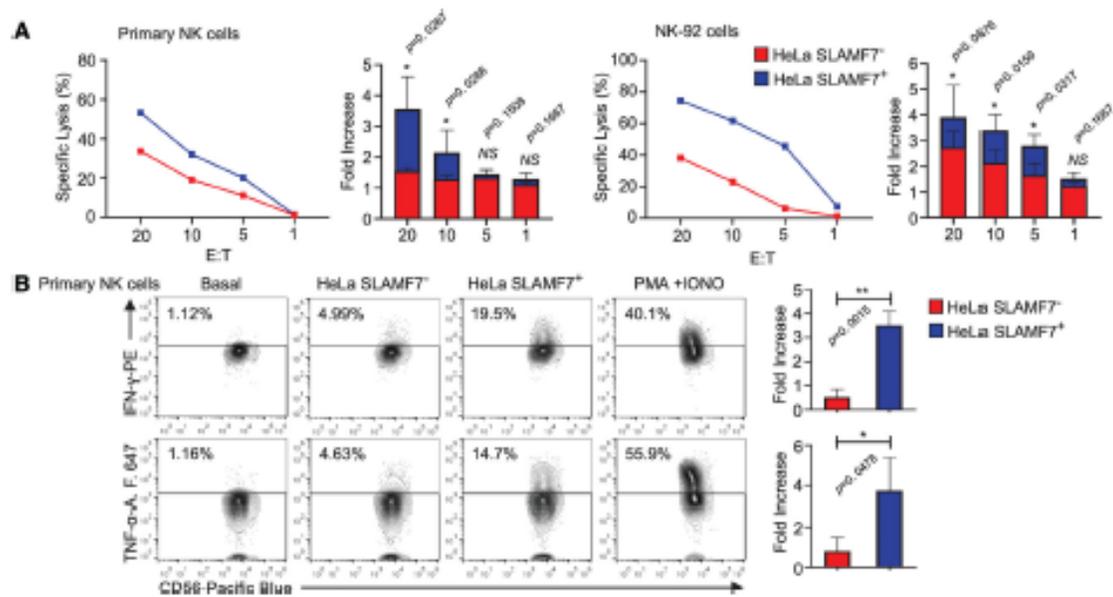


Figure 1. Self-ligation of SLAMF7 enhances the effector functions of human NK cells. (A) A flow cytometry-based assay was used to assess the NK cell-mediated cytotoxicity in human NK cells. Primary human NK cells or the human NK cell line NK-92 (effectors) were incubated with HeLa SLAMF7⁻ (shown in red) or HeLa SLAMF7⁺ (shown in blue) cells at the indicated effector-to-target ratios for 4 h at 37°C. Data are represented as percentages of specific lysis. A representative experiment using primary NK cells or NK-92 cells are shown. Data from multiple experiments are depicted for primary NK cells from different healthy donors and for NK-92 cells. Mean values with error bars and SD of four independent experiments for primary NK cells and NK-92 cells are shown. (B) Primary IL-2-treated NK cells were stimulated with HeLa cells expressing (-) or lacking (+) SLAMF7, at a 1:1 ratio. IFN- γ and TNF- α production was evaluated by intracellular staining. In addition, NK cells were stimulated with PMA plus ionomycin as positive control for the production of cytokines. Mean values with error bars and SD of at least three independent experiments are shown. All statistics were calculated using the unpaired Student's t-test (two-tailed).

to form conjugates with HeLa cells expressing SLAMF7 when compared with HeLa cells lacking SLAMF7 expression (Fig. 2A and B). These data show that SLAMF7 does not significantly affect NK cell adhesion as a mechanism to enhance NK cell activation.

SLAMF7 does not promote lytic granule polarization in human NK cells

Once NK cells adhere to target cells, a series of subsequent cellular events, including directed secretion of lytic granules and their release onto vicinity with target cells, are required to achieve an efficient NK cell-mediated lysis. In NK cells, the polarization of lytic granules along MTOC and other cytoskeleton elements, is dependent on the $\beta 2$ integrin LFA-1 ligation by ICAM-1 expressed on target cells [4, 32]. A role for 2B4 and CD16 has also been noticed in regulate lytic granule polarization in NK cells suggesting that other receptors besides LFA-1 can influence lytic granule polarization [3, 26]. In light of these findings, we decided to assess lytic granule polarization by visualizing MTOC and perforin distribution in the cytosol of NK cells that have formed conjugates with HeLa cells expressing or not SLAMF7. These assays were conducted in NK-92 cells on the basis that they are more homo-

neous and adequate to analyze by confocal microscopy. To properly identify effector cells, NK-92 were stained with an orange cell tracker whereas the target cells were identified by GFP expression. In addition, cells were labeled with anti-perforin and anti-tubulin antibodies for detection of cytotoxic granules and MTOC respectively. In some experiments, cells were additionally stained with phalloidin to highlight polymerized actin. The distribution of MTOC and lytic cytotoxic granules were evaluated at time 0 and 20 min in single-cell conjugates between effector and target cells. As shown in Fig. 3A and B, around 70% of NK-92 cells polarized their cytotoxic granules toward the contact site with HeLa cells lacking SLAMF7 expression at 20 min of stimulation when compared with time 0. When we measured the percentage of NK-92 cells that polarized perforin-containing granules toward contact site with HeLa cells expressing SLAMF7, no significant differences were found compared to HeLa cells with no SLAMF7 expression (Fig. 3A and B). The data suggest that SLAMF7 does not affect the percentage of NK cells that polarize lytic granules towards sensitive target cells. We also analyzed the number of lytic granules that polarized to contact sites with target cells by measuring the fluorescence intensity of perforin in an area just beneath the membrane juxtaposition between effector and target cells. Our analysis revealed that no significant differences were found in the fluorescence intensity for perforin in those conjugates between NK cells

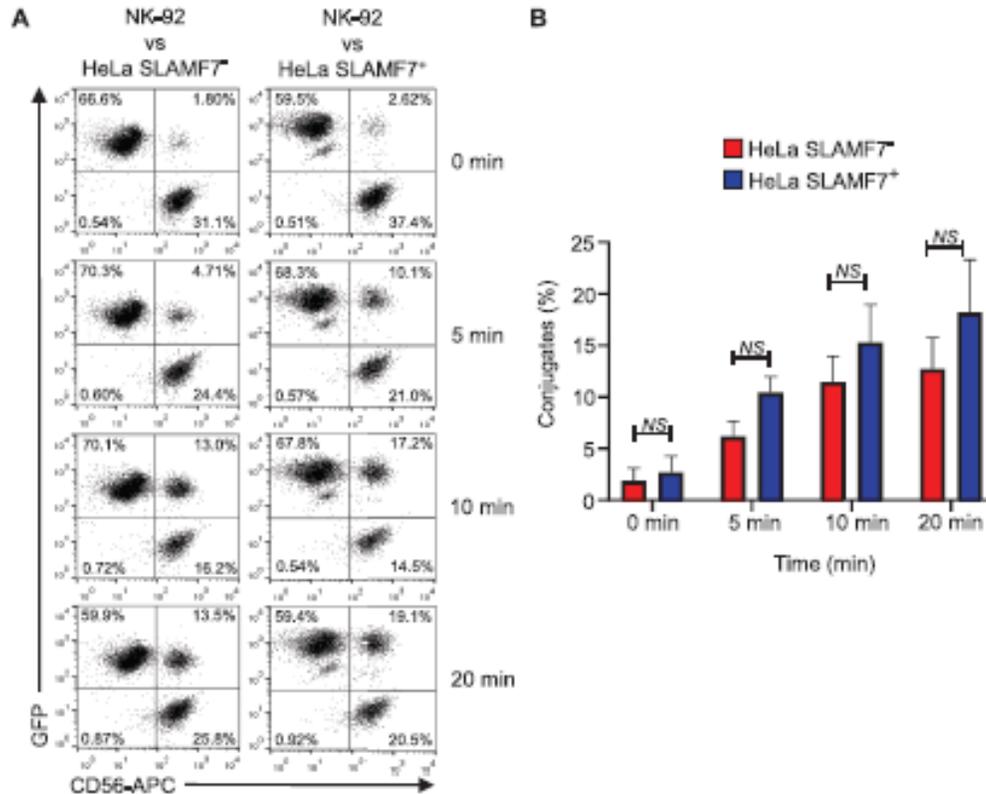


Figure 2. SLAMF7 does not promote conjugate formation in human NK cells. (A) NK-92 cells were labeled with APC-conjugated anti-CD56 and incubated with HeLa SLAMF7⁺ or HeLa SLAMF7⁻ cell for 0, 5, 10, or 20 min at 37°C. Percentages of conjugated formation are shown at the top right of each dot plot. Conjugate formation was analyzed by flow cytometry. A representative experiment of three independent experiments is shown. (B) Mean values with error bars and SD of at least three independent experiments are shown. All statistics were calculated using the unpaired Student's t-test (two-tailed).

with target cells expressing or not SLAMF7 (Fig. 3C). All these data together suggest that SLAMF7 has no incidence in affecting lytic granule polarization in human NK cells.

SLAMF7 enhances NK cell degranulation

One of the last events required to allow efficient lysis of target cells is the fusion of cytotoxic granules with the cytoplasmic membrane, a process also known as degranulation. This event is necessary to release the cytotoxic granule content into the interface that is formed between the NK cell and its target. In resting NK cells, this discrete step is mediated by a strict complementation of signals emanating from various activating receptors [3, 4, 33]. To ascertain whether SLAMF7 engagement is able to influence the fusion of cytotoxic granules with the cellular membrane, we performed degranulation assays by measuring the cell-surface appearance of CD107a as previously described [34]. NK-92 and primary NK cells were incubated with HeLa cells expressing or not SLAMF7 in a three hours degranulation assay. As shown in Fig. 4A,

incubation of NK-92 cells with HeLa cells lacking SLAMF7 expression induced a slight increase in the percentage of NK cells that upregulated CD107a at the cell surface (around 3%) compared to NK-92 cells alone (less than 1%). Interestingly, the expression of SLAMF7 on HeLa cells induced a dramatic increase (more than five-fold induction) in the percentage of NK cells with CD107a at the cell surface (around 25%). When the results were expressed as fold-induction, there was a clear statistically significant difference (Fig. 4B). When IL-2-activated NK cells were used as effector cells, similar results were obtained (Fig. 4B-C). These results show that SLAMF7 self-ligation is able to promote a strong NK cell degranulation and may represent the major cellular mechanism by which SLAMF7 enhances NK cell effector functions.

SLAMF7-mediated NK cell degranulation depends predominantly on PLC- γ

With the exception of CD16, none activating receptor is able to sustain NK cell degranulation by itself [3]. Instead, the simulta-

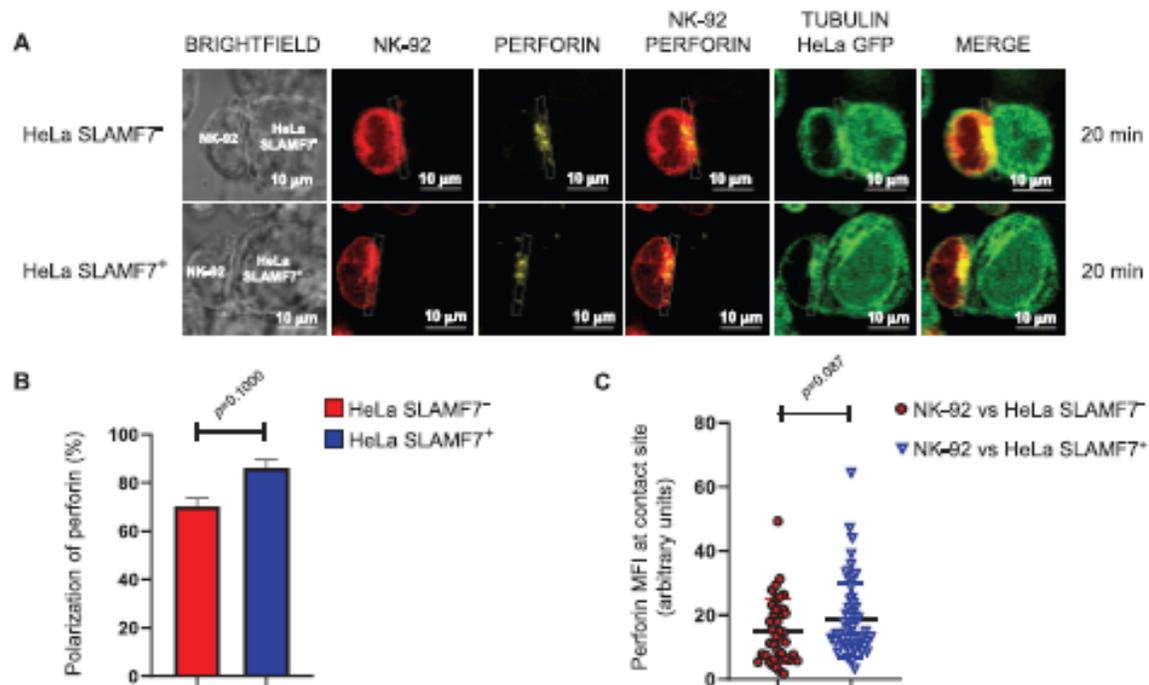


Figure 3. SLAMF7 does not influence granule polarization in human NK cells. (A) NK-92 cells were stained with CellTracker Orange and incubated with GFP-positive HeLa SLAMF7^{-/-} or HeLa SLAMF7^{+/+} cells for 20 min. Then cells were stained with anti-tubulin and anti-perforin. Conjugates were analyzed by confocal microscopy. Individual staining for a representative conjugate is shown. Scale bars (10 μ m) in white lines are shown at the bottom of each image. A representative experiment of three independent experiments is shown. (B) A graphic representation, with standard deviations of percentages of NK-92 cells that polarized perforin polarization towards the contact site with target cell, are shown. At least 100 different conjugates were analyzed for each cell condition. (C) A graphic representation for the MFI for perforin at the site of contact between effector and target cells was evaluated. Each dot represents a single NK cell conjugate with target cell. At least 40 different conjugates were analyzed for each cell condition. The thick lines and bars represent the standard deviations and mean respectively. All data are representative of at least three independent experiments. All statistics were calculated using the unpaired Student's t-test (two-tailed).

neous engagement of at least two different activating receptors is necessary for NK cells to degranulate. The underlying mechanisms for such requirement can be explained on the basis that each receptor provides a unique signaling module that converge into a critical signaling element which may be necessary to reach certain activation threshold [33]. Based on this idea, PLC- γ 2 and PI3K have emerged as two key signaling proteins that are required to sustain NK cell degranulation [31]. To ascertain whether these two signaling pathways were involved in the SLAMF7-mediated degranulation in human NK cells, we used the well-characterized inhibitors U73122 and LY294002 to abolish PLC- γ and PI3K activities, respectively. Therefore, NK92 cells were incubated with HeLa cells expressing or not SLAMF7 in the absence or presence of each selective pharmacological inhibitor, and its impact on the specific lysis of target cells or appearance of CD107a on the NK cell surface was tested. As shown in Fig. 5A, and as shown in Fig. 1, the expression of SLAMF7 on HeLa cells enhanced the NK cell-mediated lysis compared to that induced by HeLa cells lacking SLAMF7 expression. The presence of the PLC- γ inhibitor abolished completely the specific lysis of both HeLa and HeLa expressing SLAMF7 to or under basal levels. In contrast to the effect of the

PLC- γ inhibitor, the presence of the PI3K inhibitor also diminished the lysis of HeLa lacking SLAMF7 expression; however, the lysis of HeLa cells expressing SLAMF7 was reduced partially. Interestingly, the difference observed for the killing of HeLa cells expressing SLAMF7 compared to HeLa cells lacking SLAMF7 expression was preserved in the presence of the PI3K inhibitor but not in the presence of PLC- γ . These data suggest that the PLC- γ may play a more prominent role than PI3K in the SLAMF7-mediated NK cell enhanced cytotoxicity. In order to evaluate whether PLC- γ also is essential to mediate SLAMF7-mediated degranulation in human NK cells, we determined the impact of the PLC- γ and PI3K inhibitors on NK cell degranulation in response to HeLa cells expressing or not SLAMF7. As shown Fig. 5B, SLAMF7 expression on HeLa cells induced a strong increase in the percentage of NK cells expressing CD107a at the cell surface. The presence of the PLC- γ inhibitor abolished the SLAMF7-mediated NK cell degranulation to basal levels (Fig. 5B). In contrast, the PI3K inhibitor did not impact significantly on the NK cell degranulation promoted by SLAMF7 self-ligation (Fig. 5B). These data demonstrate that PLC- γ is sufficient to mediate SLAMF7-dependent NK cell degranulation and in consequence NK cell-mediated lysis.

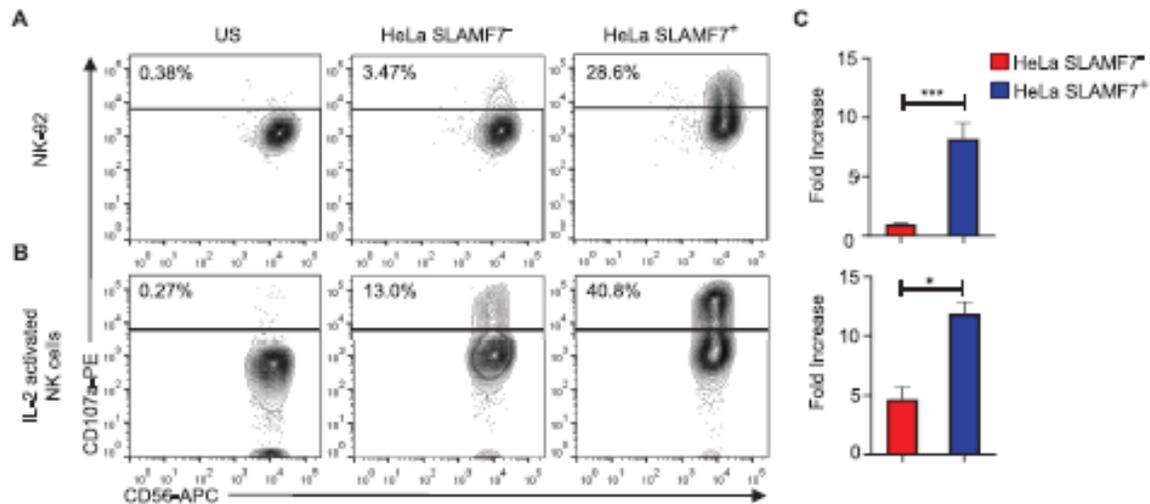


Figure 4. SLAMF7 enhances degranulation in human NK cells. (A) NK-42 cells or (B) Interleukin (IL)-2 (100 U/ml) activated primary human NK cells were stimulated with HeLa SLAMF7⁻ or HeLa SLAMF7⁺ cells for 3 h at 37°C. Then, cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD56 and anti-CD107a antibodies. NK cells were gated away from target cells based on GFP expression. Profiles show CD56 versus CD107a as indicated. A representative experiment of three independent experiments is shown. Primary NK cells were from three different healthy donors (C) Data are expressed as the fold increase of NK cells expressing CD107a at cell surface. Error bars represent the standard deviations. Combined data of three independent experiments. The statistics were calculated using the unpaired Student's *t*-test (two-tailed).

Discussion

Unlike T and B lymphocytes, where the antigen receptors guide activation, NK cells express an array of cell surface receptors that, upon ligation, provide signals that lead to activation of NK cells [35]. Under this scenario, it is essential to understand the specific contribution of the multiple receptors that influence NK cell activation. Studies based on the use of insect cells as target cells expressing specific ligands for various activating receptors have shed some clues on this important issue. According to these studies, no single receptor is sufficient to sustain all series of events encompassed during NK cell activation. Instead, activating receptors impact on NK cell activation by affecting only some of the various discrete events that are necessary to fulfill NK cell activation [3, 8, 36]. However, only some activating receptors were tested in these studies remaining inconclusive whether all activating receptors fit under this model of NK cell activation.

Among receptors to play an important role as regulators of natural NK cell-mediated cytotoxicity are those grouped in the SLAM family [37–40]. These receptors have been shown to be essential to guide NK cell lysis towards hematopoietic cells, in part as a consequence of their expression restricted to the hematopoietic compartment [21, 22]. However, ectopic expression of SLAM family members in non-hematopoietic target cells, turn them highly susceptible to NK cell-mediated lysis. All activating functions attributed to all members of the SLAM family are dependent on the recruitment of members of SAP family of adapters [13]. Indeed, by means of different mechanisms, both SAP and EAT-2 are able to trigger activating signals downstream SLAM family receptors [37, 41]. Among SLAM family receptors, SLAMF7

is the only receptor able to recruit EAT-2 but not SAP whereas the other members can recruit both, SAP and EAT-2. Studies in mouse models have demonstrated that SLAMF7 expression on target cells enhanced NK cell-mediated cytotoxicity by using a mechanism dependent on EAT-2 [22]. Moreover, in the absence of EAT-2, signals delivered by SLAMF7 turn out to be inhibitory rather than activating. Interestingly, both, activating and inhibitory functions were regulated by independent tyrosine residues [22]. In human NK cells, SLAMF7 also has activating functions and as in mouse NK cells, this activating role seems to be dependent on EAT-2 recruitment [25, 28]. Despite these activating attributes of SLAMF7 in both, mouse and human NK cells, no much is known about the modes of action by which SLAMF7 favors NK cell mediated-cytotoxicity.

To ascertain the mechanism by which SLAMF7 regulates NK cell activation, we first analyzed the expression of SLAMF7 in resting primary NK cells that were treated with cytokines that influence NK cell effector functions. Our results showed that SLAMF7 expression was tightly regulated by IL-2, IL-12, and IL-15, but no effect was observed for type 1 IFN and TGF- β . The fact that SLAMF7 was upregulated in response to IL-2 and IL-15 treatment suggest that by tuning SLAMF7 expression, cytokines may influence NK cell activation. Regarding SLAMF7 expression in resting NK cells, we noticed that among SLAM receptors expressed in NK cells, the one observed for SLAMF7 was highly variable among healthy individuals compared to that observed for other SLAM family members (data not shown), the reason for this remains to be determined.

Previous studies have shown that in both, mouse and human NK cells, the physiological ligation of SLAMF7 resulted in

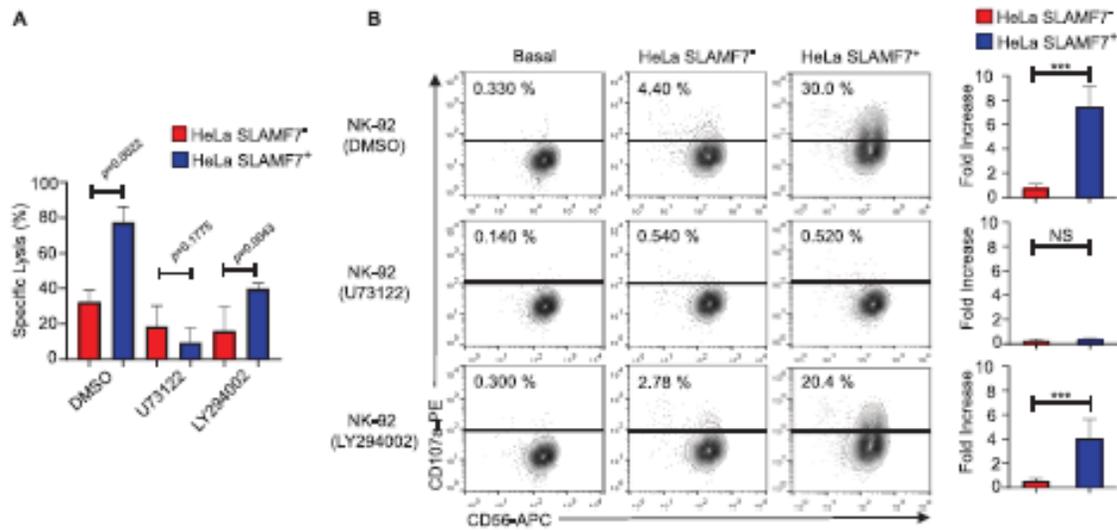


Figure 5. SLAMF7-dependent lytic granule exocytosis predominantly requires PLC- γ . NK-92 cells were pretreated for 30 min with DMSO (Vehicle), the PLC- γ inhibitor U73122, or the PI3K inhibitor LY294002. Then, cells were incubated with target cells for 4 h for a flow cytometry-based cell-mediated cytotoxicity assay (A) or a 3 h degranulation assay (B). (A) Data are represented as a percentage of specific lysis at an effector cell/target cell ratio of 10:1. Mean values with error bars and SD of at least three independent experiments are shown. (B) Cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD56 and anti-CD107a antibodies. NK cells were gated away from target cells based on GFP expression. Profiles show CD56 versus CD107a as indicated. Data are representative of at least three independent experiments. On the right, data are expressed as the fold increase of NK cells expressing CD107a at cell surface. Error bars represent the standard deviations. Combined data of three independent experiments. The statistics were calculated using the unpaired Student's *t*-test (two-tailed).

enhanced NK-mediated cytotoxicity [21, 22, 29]. However, these studies were based on the use of IL-2-activated NK cells or using MHC-class I negative cells. In consequence, we used a model where no other SLAM receptor was expressed and unlike previous studies, target cell was positive for MHC class I expression. The use of HeLa cells turned to meet both features. Our results showed that in contrast to HeLa cells lacking SLAMF7 expression, HeLa cells expressing SLAMF7 were more susceptible to NK cell-mediated lysis, corroborating that homophilic SLAMF7 interactions resulted in an enhanced NK cell activation. These results were observed for resting NK cells and for the human NK cell line NK-92, the latter expressing higher levels of SLAMF7. In addition to NK cell-mediated cytotoxicity, SLAMF7 expression in HeLa cells also resulted in an enhanced IFN- γ and TNF- α production by primary IL-2-activated NK cells when compared to HeLa cells lacking SLAMF7 expression. We were also able to observe a significant increase in the TNF- α production in NK-92 cells. In contrast, no cytokine secretion was observed in primary resting NK cells in response to HeLa cells expressing SLAMF7. This can be explained by the relative low expression of SLAMF7 in resting NK cells compared to IL-2-treated NK cells or NK-92 cells. Our data showed that SLAMF7 self-ligation enhanced NK cell effector functions. Moreover, these findings were observed in target cells expressing MHC class I molecules, suggesting that activating signals delivered as a consequence of SLAMF7 self-ligation were dominant over putative inhibitory signals mediated by ligation of receptors for MHC class I molecules.

In order to ascertain the mechanisms by which SLAMF7 enhanced NK cell effector functions, we assessed the impact of SLAMF7 ligation on discrete cellular events previously described [9, 33]. A first approach was to evaluate the role of SLAMF7 in NK cell adhesion. Our results, based on assays aimed to measure the ability of NK cell to form cell conjugates with HeLa cells expressing or not SLAMF7, demonstrated that SLAMF7 did not regulate cell adhesion in human NK cells. Previous studies have shown that 2B4, a SLAM family member, is able to enhance NK cell adhesion [23, 42]. This effect may be explained by enhancing the affinity of LFA-1 for ICAM-1 by using a mechanism dependent on SAP. Consistent with these findings, SAP-deficient cytotoxic T cells and CD4⁺ T cells exhibited an impaired adhesion to B cells [43, 44] suggesting that while recruiting SAP SLAM receptors may regulate cell adhesion among immune cells. Our results showed that SLAMF7 did not affect NK cell adhesion and this may be explained by the inability of this receptor to recruit SAP. Moreover, our data also suggest a non-redundant role for all SLAM receptors.

As cell adhesion, the movement of lytic granules along other cytoskeleton and signaling elements is determinant for NK cells to achieve efficient delivery of lytic granules content toward target cells. The analysis of confocal microscopy studies indicates that SLAMF7 did not significantly enhance the percentage of NK cells that polarized lytic granules toward interface with targets cells, irrespectively of whether target cells expressed or not SLAMF7. Moreover, we did not find a significant difference in the median fluorescence intensity for perforin in the contact area between NK

cells and target cells, suggesting that SLAMF7 self-ligation does not influence the number of lytic granules that reach the immunological synapse. Unlike SAP, which regulates cell adhesion, EAT-2 has been shown to promote granule lytic polarization toward NK cell immunological synapse [26]. Since SLAMF7 is able to bind EAT-2 in both mouse and human NK cells [22, 28], it was surprising that SLAMF7 did not affect cytotoxic granule polarization. A possible explanation for this is that the recruitment of EAT-2 to different SLAM family members does not necessarily imply that the same signaling pathways downstream EAT-2 will be triggered. A more detailed analysis on the mechanisms by which the recruitment of EAT-2 by different SLAM family receptors may or may not result in different cellular outcomes needs to be further explored.

In contrast to NK cell adhesion and NK cell lytic granule polarization, SLAMF7 significantly enhanced NK cell exocytosis of lytic granules and this was observed for both, primary NK cells and NK-92 cells. Our data were observed using HeLa cells, which do not express any member of the SLAM family. Thus, our data clearly showed that this enhanced NK cell degranulation was the result of SLAMF7 engagement by SLAMF7 expressed in the target cells and not as a consequence of the ligation of another SLAM family member. Moreover, our data support a model for NK cell activation where activating receptors influence discrete cellular events rather than affecting multiple cellular processes.

In order to ascertain the mechanisms by which SLAMF7 enhances NK cell degranulation, we followed an approach based in the use of selective pharmacological inhibitors of signaling proteins. Our data showed the inhibition of PLC γ with the selective inhibitor U73122 abrogated the SLAMF7-dependent NK cell degranulation. In contrast, the use of LY294002, a selective inhibitor for PI3K, decreased the overall NK cell-mediated lysis and partially affected the enhanced SLAMF7-mediated NK cell degranulation. Thus, our results suggest that the SLAMF7-promoted NK cell degranulation depends on PLC- γ and to a lesser extent on PI3K. Our data were in line with studies in NK cells from PLC- γ 2 deficient mice, where lytic granule polarization toward sensitive target cells was normal but degranulation was totally abolished [45]. Moreover, PLC- γ was also necessary to sustain NK cell degranulation induced by both ITAM-dependent and ITAM-independent pathways [2]. PI3K has been also shown to have a predominant role in NK cell activation. The use of pharmacological inhibitors for PI3K, including LY294002 and Wortmannin, abolished the movement of perforin and granzyme B towards target cells and suppressed NK cell-mediated lysis of target cells [46]. In addition, PI3K was also responsible to mediate activation of the Rac1-MEK-ERK pathway, which is required for actin reorganization and cellular polarization [47]. Further studies based on knocking down p85 α expression in the NK cell line YTS, showed that PI3K was required for lytic granule polarization to the immunological synapse [48]. NK cells from PI3K β deficient mice displayed an impaired NK cell function towards tumor cell lines including lytic granule exocytosis [49, 50], whereas the use of pan-PI3K inhibitors showed that, PI3K is necessary for a normal NK cell function, selective inhibition of different isoforms of PI3K did not significantly affect their function [51], suggesting that

the genetic loss of PI3K may result in an abnormal NK cell development which is not appreciated when PI3K is inhibited in mature NK cell lines [52, 53]. Therefore, the definitive role of the different isoforms for PI3K NK cell development and function needs to be explored in more detail.

All these findings may have important implications in the capability of NK cells to control hematopoietic malignancies. SLAMF7 is abundantly expressed in multiple myeloma [54], chronic lymphocytic leukemia [55], NK/T-cell lymphomas, and large granular lymphocyte leukemia [56]. Therefore, the recognition of these malignancies in a SLAMF7-dependent manner may provide NK cells with signals that are necessary to organize efficiently the killing machinery. Whether an aberrant expression of SLAMF7 in NK cells results in an inefficient killing of such hematological malignancies needs to be determined. In conclusion, we provide new evidence that physiological ligation of SLAMF7 enhanced effector functions in human NK cells by influencing degranulation and cytokine secretion rather than cell adhesion or lytic granule polarization. Moreover, our results suggest a non-redundant role for SLAMF7 among SLAM family receptors.

Materials and Methods

Isolation of human primary NK cells and cell culture

Human peripheral blood mononuclear cells derived from healthy donors were isolated by density gradient centrifugation (Picol-Hypaque, GE Healthcare Life Sciences). Then, human isolated NK cells were obtained by negative selection using the MojoSort Human NK Cell Isolation Kit (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. Purity for isolated CD56⁺CD3⁻ NK cells was >90%. Human NK cells were cultured in Advanced RPMI-1640 medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 5 % (v/v) FBS (Byproducts), 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, L-glutamine, and 2-mercaptoethanol (Invitrogen Life Technologies). The human NK cell line NK-92 were purchased from ATCC and cultured in RPMI-1640 7% (v/v) FBS, 7% (v/v) horse serum (ATCC), 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, L-glutamine, 2-mercaptoethanol, and 100 U/ml of recombinant human IL-2 (PeproTech). HeLa cells, a cervical cancer cell line, were used as target cells and were cultured in DMEM (Advanced) 5 % (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and L-glutamine.

First-strand cDNA synthesis and PCR

First-strand cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using oligo(dT) primers and Superscript II reverse transcriptase following manufacturer's instruction (Invitrogen Life Technologies). cDNA samples were amplified with SLAMF7-specific PCR primers and Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies) in a DNA

Thermocycler (BioRad). PCR for GAPDH mRNA was performed as described using specific primers.

Antibodies for flow cytometry and reagents

The following human antibodies were used: PerCP/Cy5.5-anti-CD319 (162.1), FITC-anti-CD3 (OKT3), PE-anti-CD107a (H4A3), APC-anti-CD56 (5.1H11), Pacific Blue-anti-CD56 (5.1H11), and Alexa Fluor-647-anti-TNF- α (Mab11), all from BioLegend; the Alexa Fluor-488-anti- α -Tubulina (DM1A), anti-Perforin (delta G9), and Alexa Fluor-647-goat anti-mouse IgG (H+L) were from Life Technologies. Reagents used were Brefeldin A (SIGMA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (SIGMA), and Ionomycin (SIGMA). The PLC- γ inhibitor U73122 and the PI3K inhibitor LY294002 were purchased from Merck Millipore. All cytokines used in this study were purchased from PreproTech. Flow cytometric analyses were conducted in accordance with the guidelines used for immunological studies [57]. Gating strategy is illustrated in the Supporting Information (Supporting Information Fig. 5).

Cytokine stimulation

For cytokine stimulation, peripheral blood mononuclear cells were incubated with the following cytokines: IL-2 (100 UI/ml), IFN- β (10ng/ml), IL-15 (50ng/ml) plus IL-12 (10ng/ml), or TGF- β (10ng/ml) and cultured at 37 °C for 48 or 120 h. Afterward, cells were stained with FITC-anti-CD3, APC-anti-CD56, and PE-anti-SLAMP7 antibodies. After staining, cells were washed and fixed with 2% paraformaldehyde. All samples were acquired using a BD FACSCalibur II (BD Biosciences) and analyzed by FlowJo v10 software (Tree Star). SLAMP7 expression was analyzed in the NK cell population defined as CD3⁻CD56⁺.

NK cell cytotoxicity assays

To assess natural cytotoxicity, primary NK cells or NK-92 cells were incubated with target GFP-positive HeLa cells expressing or not SLAMP7 (HeLa SLAMP7⁺ or HeLa SLAMP7⁻) in 96 well plates for 4 h at 37°C at various effector/target ratios. After, cells were harvested and stained for dead cells with LIVE/DEAD fixable Violet Cell Stain Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed and fixed with paraformaldehyde at 2%. Samples were acquired using a BD FACSCalibur II (BD Biosciences) and analyzed by FlowJo v10 software (Tree Star). The percentage of specific lysis was calculated according to the following formula: (experimental death-basal death)/(maximum death-basal death) \times 100. In some experiments, NK-92 cells were pretreated with DMSO (vehicle), the pharmacological PLC- γ inhibitor U73122 (2.5 μ M), or the PI3K inhibitor LY294002 (25 μ M) for 30 min at room temperature. Then, cells were washed, resuspended in fresh medium, and incubated with target cells as mentioned above.

Conjugate formation assays

NK-92 cells were incubated for 30 min on ice with APC-conjugated CD56 monoclonal antibody. Then, cells were washed and resuspended at 5 \times 10⁵ cells per ml and 100 μ l of cell suspension was added to 100 μ l of GFP-positive HeLa cells expressing or not SLAMP7 (2 \times 10⁶ cells per ml). Mixed cells were centrifuged at 500 rpm 3 min (4 °C) to allow conjugate formation and then stimulated by incubating them at 37°C for 0, 5, 10, or 20 min. Reactions were stopped by adding ice-cold 0.5% paraformaldehyde in PBS. Samples were acquired using a BD FACSCalibur II (BD Biosciences) and conjugate formation was analyzed by FlowJo v10 software (Tree Star).

Confocal Microscopy and image analysis

GFP-positive HeLa cells expressing or not SLAMP7 were plated (2 \times 10⁵ cells by well) onto poly-L-lysine-coated chambered cover glass (Lab-Tek) and incubated overnight at 37°C. Before adding NK cells, NK-92 cells were stained with Cell Tracker Orange CMRA (Molecular Probes) at 0.5 μ M for 30 min at 37°C. Then, cells were washed and resuspended in complete RPMI medium and incubated on ice for 30 min. HeLa SLAMP7⁺ or HeLa SLAMP7⁻ cells plated were washed and mixed with NK-92 cells Orange⁺ (1 \times 10⁵ cells). After, co-cultures were incubated on ice for 30 min to allow conjugate formation. Cell mixtures were incubated at 37 °C for 20 min. Cells were then fixed with 1% paraformaldehyde, washed two times, and permeabilized with 500 μ l of cold methanol for 5 min on ice. Cells were stained with primary anti-perforin antibody for 30 min on ice, then washed and stained with an Alexa Fluor 647-conjugated secondary antibody (dilution 1:500) for additional 30 min on ice. Cells were washed, and finally stained with FITC-anti- α tubulin antibody. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and examined at 60x in a confocal Olympus FV100 inverted microscope. Several slices were taken to analyze polarization of perforin at the contact site between effector and target cell. Polarization of perforin at the area of contact between the NK-92 cells and target cells were quantitated as the MFI. At least 100 different conjugates were analyzed for each cell type or condition. Microscope images were processed and analyzed using ImageJ software (version v1.53i; National Institutes of Health).

NK cell degranulation and intracellular cytokine staining

To assess NK cell degranulation, primary NK cells or NK-92 cells were cultured along the same number of target cells (2 \times 10⁵) in 96 well plates, centrifuged at 500 rpm by 3 min to allow conjugate formation and incubate them a 37°C for 3 hrs. Cells were harvested and stained for 30 min on ice with FITC-anti-CD3, APC-anti-CD56, and PE-anti-CD107a antibodies. Degranulation was analyzed by quantifying the percentage of NK cells expressing CD107a⁺ at the cell surface. In some experiments, NK-

92 cells were pretreated with DMSO (vehicle), the PLC γ inhibitor U73122 (2.5 μ M), or the PI3K inhibitor LY294002 (25 μ M) for 30 min at room temperature. Then, cells were washed and incubated with target cells as described above. To measure the production of INF- γ and TNF- α , primary NK cells or NK-92 cells (2×10^5) were stimulated with HeLa cells expressing or not SLAMF7 (2×10^5) at one to one ratio in the presence of brefeldin A (5 μ g/ml). After 6 h, cells were stained with FITC-anti-CD3 and Pacific Blue-anti-CD56 antibodies for 30 min on ice and then fixed with Cytotfix/Cytoperm Buffer (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Cells were stained with an Alexa Fluor 488-anti-IFN- γ antibody or Alexa Fluor 647-anti-TNF- α antibody. After staining, cells were washed and fixed with 2% paraformaldehyde. NK cells were defined as CD3 $^+$ CD56 $^+$. In parallel, cells were also stimulated with PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (0.5 μ g/ml).

Constructs

The human SLAMF7 encoding cDNA was cloned in the retroviral vector pFB-GFP which also encodes for the GFP. For expressing SLAMF7, HeLa cells were infected using the supernatant from the Phoenix packaging cells previously transfected with the pFB-GFP-SLAMF7 vector and the vesicular stomatitis virus (VSV) G protein plasmid pMD-G. HeLa cells were also infected with retroviruses encoding pFB-GFP. After infection, GFP-positive cells were isolated by cell sorting. Cell sorting was performed by using a BD FACSAria III (BD Biosciences).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test (two-tailed). All statistics were calculated using Prism 8.0.1 (GraphPad Software).

Acknowledgments: The authors want to acknowledge to Vijaya Madhoo for reading the manuscript, to Erika Melchy-Perez for her technical assistance in Flow Cytometry, and to Chris Wood, director of the Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada/UNAM for the assistance and technical support in confocal microscopy.

Funding information: MECM is supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 241854) and received funding from The Canadian Institutes of Health Research (CIHR)-International Development Research Center (IDRC) hold by André Veillette.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Data availability statement: Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Peer review: The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.202149406>

References

- Quatrini, L., Chiesa, M. D., Sivori, S., Mingari, M. C., Fende, D. and Moretta, L., Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 2021.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O., Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunity* 2006. 214: 73–91.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O., Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006. 107: 159–166.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H. G. and Long, E. O., Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* 2005. 202: 1001–1012.
- Barber, D. F. and Long, E. O., Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J. Immunol.* 2003. 170: 294–299.
- Kupfer, A., Denhart, G. and Singer, S. J., Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. 80: 7224–7228.
- Orange, J. S., Harris, K. E., Andzelm, M. M., Valter, M. M., Geha, R. S. and Strominger, J. L., The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100: 14151–14156.
- Wulftang, C., Purdie, B., Klein, J. and Schatzle, J. D., Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100: 7767–7772.
- de Saint Basile, G., Menasche, G. and Fischer, A., Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10: 568–579.
- Chen, X., Allan, D. S. J., Krzewski, K., Ge, B., Kocow, H. and Strominger, J. L., CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. 103: 10346–10351.
- Veillette, A. and Latour, S., The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2003. 15: 277–285.
- Veillette, A., Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. 6: 56–66.
- Veillette, A., SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. 2: a002469.
- Ostrakhovitch, E. A. and Li, S. S., The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. *Biochem. Cell. Biol.* 2006. 84: 832–843.
- Howie, D., Sitarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J. and Terhorst, C., Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 2002. 99: 957–965.
- Tangye, S. G., Lazotte, S., Woollett, E., Sutherland, C. R., Lanier, L. L. and Phillips, J. H., Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor,

- recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 1999, 162: 6981–6985.
- 17 Latour, S., Gish, G., Helgason, C. D., Humphries, R. K., Pawson, T. and Vellietto, A., Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat. Immunol.* 2001, 2: 681–690.
 - 18 Latour, S., Roncagalli, R., Chen, R., Baktowski, M., Shi, X., Schwartzberg, P. L. et al., Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat. Cell Biol.* 2003, 5: 149–154.
 - 19 Melnke, S. and Watzl, C., NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Front. Immunol.* 2013, 4: 3.
 - 20 Bloch-Queyrat, C., Fondascho, M. C., Chen, R., Yin, L., Relouzat, F., Vellietto, A. et al., Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J. Exp. Med.* 2005, 202: 181–192.
 - 21 Dong, Z., Cruz-Munoz, M. E., Zhong, M. C., Chen, R., Latour, S. and Vellietto, A., Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2009, 10: 973–980.
 - 22 Cruz-Munoz, M. E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S. and Vellietto, A., Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat. Immunol.* 2009, 10: 297–305.
 - 23 Dong, Z., Davidson, D., Perez-Quintero, L. A., Kurosaki, T., Swat, W. and Vellietto, A., The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells. *Immunity* 2012, 36: 974–985.
 - 24 Claus, M., Melnke, S., Bhat, R. and Watzl, C., Regulation of NK cell activity by 2B4, NTB-A and CRACC. *Front. Biosci.* 2008, 13: 956–965.
 - 25 Stark, S. and Watzl, C., 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int. Immunol.* 2006, 18: 241–247.
 - 26 Perez-Quintero, L. A., Roncagalli, R., Guo, H., Latour, S., Davidson, D. and Vellietto, A., EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase Cgamma, Ca⁺⁺, and Erk, leading to granule polarization. *J. Exp. Med.* 2014, 211: 777–742.
 - 27 Bouchon, A., Cella, M., Grierson, H. L., Cohen, J. I. and Colonna, M., Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J. Immunol.* 2001, 167: 5517–5521.
 - 28 Tassi, I. and Colonna, M., The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J. Immunol.* 2005, 175: 7996–8002.
 - 29 Johnson, D. R., Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J. Immunol.* 2003, 170: 1894–1902.
 - 30 Long, E. O., Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol. Rev.* 2008, 224: 70–84.
 - 31 Bryceson, Y. T. and Long, E. O., Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20: 344–352.
 - 32 Barber, D. F., Pauro, M. and Long, E. O., LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 2004, 173: 3653–3659.
 - 33 Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E. and Rajagopalan, S., Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 2013, 31: 227–258.
 - 34 Bryceson, Y. T., Fende, D., Maul-Pavlic, A., Gilmour, K. C., Uffell, H., Vratetz, T. et al., A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 2012, 119: 2754–2763.
 - 35 Lanier, L. L., NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23: 225–274.
 - 36 Bryceson, Y. T., Ljunggren, H. G. and Long, E. O., Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* 2009, 114: 2657–2666.
 - 37 Cannons, J. L. and Tangye, S. G., Schwartzberg P. L., SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29: 665–705.
 - 38 Ma, C. S., Nichols, K. E. and Tangye, S. G., Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2007, 25: 337–379.
 - 39 Vellietto, A., NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol. Rev.* 2006, 214: 22–34.
 - 40 Vellietto, A., Cruz-Munoz, M. E. and Zhong, M. C., SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol.* 2006, 27: 228–234.
 - 41 Vellietto, A., SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *J. Exp. Med.* 2004, 199: 1175–1178.
 - 42 Guo, H., Cranert, S. A., Lu, Y., Zhong, M. C., Zhang, S., Chen, J. et al., Deletion of Slam locus in mice reveals inhibitory role of SLAM family in NK cell responses regulated by cytokines and LFA-1. *J. Exp. Med.* 2016, 213: 2187–2207.
 - 43 Zhao, F., Cannons, J. L., Dutta, M., Griffiths, G. M. and Schwartzberg, P. L., Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity. *Immunity* 2012, 36: 1003–1016.
 - 44 Cannons, J. L., Qi, H., Lu, K. T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J. et al., Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 2010, 32: 253–265.
 - 45 Caraux, A., Kim, N., Bell, S. E., Zompi, S., Ranson, T., Lesjean-Pottier, S. et al., Phospholipase C-gamma2 is essential for NK cell cytotoxicity and innate immunity to malignant and virally infected cells. *Blood* 2006, 107: 994–1002.
 - 46 Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D. L., Corliss, B. C., Hong-Geller, E., Wei, S. et al., Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2000, 1: 419–425.
 - 47 Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D. L., Corliss, B. C., Vivier, E., Hong-Geller, E. et al., Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J. Immunol.* 2002, 168: 3155–3164.
 - 48 Carlin, L. M., Evans, R., Milewicz, H., Fernandes, L., Matthews, D. E., Foran, M. et al., A targeted siRNA screen identifies regulators of Cdc42 activity at the natural killer cell immunological synapse. *Sci. Signal* 2011, 4: ra81.
 - 49 Kim, N., Saudemont, A., Webb, L., Camps, M., Ruckle, T., Hirsch, E. et al., The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* 2007, 110: 3200–3208.
 - 50 Zebadin, E., Slinna, O., Schuster, C., Putz, E. M., Fajmann, S., Warsch, W. et al., Leukemic challenge unmasks a requirement for PI3Kdelta in NK cell-mediated tumor surveillance. *Blood* 2008, 112: 4655–4664.
 - 51 Yea, S. S., So, L., Malliya, S., Lee, J., Rajasekaran, K., Malarkannan, S. et al., Effects of novel isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors on natural killer cell function. *PLoS One* 2014, 9: e99486.
 - 52 Guo, H., Samarakoon, A., Vanhaesebroeck, B. and Malarkannan, S., The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J. Exp. Med.* 2008, 205: 2419–2435.
 - 53 Mace, E. M., Phosphoinositide-3-Kinase Signaling in Human Natural Killer Cells: New Insights from Primary Immunodeficiency. *Front. Immunol.* 2018, 9: 445.
 - 54 Hsi, E. D., Steinle, R., Balasa, B., Sermania, S., Draksharapu, A., Shum, B. P. et al., CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14: 2775–2784.

- 55 von Wenserski, L., Schultheiss, C., Bolz, S., Schilfke, S., Stranica, D., Willscher, E. et al., SLAMF receptors negatively regulate B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia via recruitment of prohibitin-2. *Leukemia* 2021. 35: 1073–1086.
- 56 Elmaagach, A. H., Salwender, H., Jehn, C., Dahmash, F., Singh, A., Wilson, O. et al., Strong expression of SLAMF7 in natural killer/T-cell lymphoma and large granular lymphocyte leukemia - a prominent biomarker and potential target for anti-SLAMF7 antibody therapy. *Leuk. Lymphoma* 2019. 60: 3335–3338.
- 57 Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S. et al., Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* 2019. 49: 1457–1973.

Abbreviations: **ADCC**: antibody-dependent cellular cytotoxicity - **EAT-2**: Ewing's sarcoma-associated transcript 2 -

ITSM: immunoreceptor tyrosine-based switch motif - **MOTC**: microtubule-organizing center - **SAP**: SLAM-associated protein - **SLAM**: signaling lymphocyte activation molecule

Full correspondence: Mario E. Cruz-Muñoz Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Calle leñeros esquina iztacihuatl s/n, Col. Volcanes, CP. 62350, Cuernavaca, Morelos, México. e-mail: mario.cruz@uaem.mx

Received: 28/5/2021

Revised: 1/9/2021

Accepted: 20/10/2021

Accepted article online: 25/10/2021

