

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Células Natural Killer de Decidua Humana
e Inmunotolerancia Materno-Fetal**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas.

Hernán Diego Kopcow

Director de Tesis: Jack L. Strominger

Consejero de Estudios: Eduardo Arzt

Molecular and Cellular Biology Department

Harvard University

Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de Norteamérica

Buenos Aires, 2006

**Células Natural Killer de Decidua Humana
e Imunotolerancia Materno-Fetal**

Células Natural Killer de Decidua Humana e Inmunotolerancia Materno-Fetal.

Durante el embarazo humano el feto constituye un implante hemiallogéneo en el útero materno. Trofoblastos fetales invaden la decidua materna y como células extrañas deberían ser rechazadas. A pesar de encontrar abundantes células Natural Killer en la decidua (dNK) se mantienen a salvo de ataques por parte del sistema inmune materno.

Las células dNK constituyen 50 a 90 % de los linfocitos presentes en la decidua humana durante el embarazo temprano, sin embargo es poco lo que se conoce respecto a su función. Se compararon los perfiles de expresión de las células dNK, caracterizadas por ser CD56^{brillante}, con los perfiles de expresión de células Natural Killer periféricas de sangre (pNK) CD56^{brillante} y CD56^{tenue} por análisis con micorarrays y verificación de los datos por citometría de flujo y RT-PCR. Los resultados indican que las células dNK constituyen un subgrupo distinto a los dos subtipos de células pNK. Entre los ~10,000 genes estudiados, 278 genes mostraron un cambio de al menos tres veces en el nivel de expresión con un valor $p < 0.001$ al comparar las células dNK con ambos subtipos de células pNK. En su mayoría (197 genes) el nivel de expresión se vio incrementado en las células dNK. La mayor parte de estos genes codifican proteínas de superficie, incluyendo los inusuales receptores NKG2E y Ly-49L, varios receptores de células killer de tipo inmunoglobulina (KIRs), las subunidades de integrinas α^D , α^X , β_1 y β_5 , y múltiples tetraspaninas (CD9, CD151, CD53, CD63, y TSPAN-5).

Perforina y las granzimas A y B, moléculas efectoras de la actividad citotóxica de las células NK, también son sobre-expresadas por las células dNK. Las células dNK expresan los receptores activadores NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, y 2B4 como también LFA-1. A pesar de ser granulares y expresar las moléculas esenciales para poseer actividad lítica, las células dNK frescas mostraron tener una muy reducida actividad citotóxica sobre las células blanco MHC I negativas K562 y 721.221, aproximadamente 15% de la actividad citotóxica de las células pNK. Las células dNK formaron conjugados y sinapsis inmunológicas activadoras con células 721.221 y K562 en las que CD2, LFA-1 y actina fueron polarizadas al sitio de contacto con la célula blanco. Sin embargo, contrastando con las células pNK, fallaron en la polarización del centro organizador de microtúbulos y de gránulos conteniendo perforina hacia la sinapsis inmunológica formada, explicando la falta de citotoxicidad.

Adicionalmente, entre los genes sobre-expresados por células dNK se encuentran Galectina 1, PSG11 y PP14, tres proteínas secretadas con funciones inmunosupresoras. Galectina 1 es una lectina con afinidad por residuos de poli-N-acetilactosaminas. Posee la capacidad de inducir apoptosis de linfocitos T CD8 activados y, como aquí se muestra, de células NK. Western blots y ensayos de ELISA muestran que galectina 1 es expresada y secretada por células dNK pero no por células pNK. La tinción con Anexina V y ensayos de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling) de linfocitos de decidua frescos revelan la presencia de una población de células T apoptótica. Medios condicionados por células dNK pueden inducir apoptosis de células T periféricas activadas con PHA y de células MOLT4, una línea de células T. La capacidad apoptótica de los medios condicionados es bloqueada por lactosa, un disacárido que compite la unión de galectina 1 a sus ligandos y bloquea su capacidad apoptótica, sugiriendo que las células dNK pueden contribuir a la tolerancia materno-fetal a través de la secreción de galectina 1 entre otros mecanismos.

Palabras Claves : embarazo, relaciones materno-fetales, células natural killer, perfil de expresión de genes, subtipos de linfocitos, centro organizador de microtúbulos, perforina, galectina 1, apoptosis, inmunotolerancia, útero, decidua.

Human Decidual Natural Killer Cells and Fetal –Maternal Immune Tolerance

During human pregnancy the fetus constitutes an hemiallogeneic implant into the maternal uterus. Fetal trophoblasts invade the maternal decidua and as foreign cells they should be rejected. Despite encountering abundant NK cells in the decidua (dNK), they remain spared from attack by the maternal immune system.

Natural killer cells constitute 50–90% of lymphocytes in human uterine decidua in early pregnancy. Gene expression profiles of CD56^{bright} uterine dNK cells were compared with that of CD56^{bright} and CD56^{dim} peripheral NK cell subsets by microarray analysis, with verification of results by flow cytometry and RT-PCR. Results indicate that dNK cells constitute a distinct subgroup from both pNK subsets. Among the ~10,000 genes studied, 278 genes showed at least a threefold change with p value < 0.001 when comparing the dNK and peripheral NK cell subsets, most displaying increased expression in dNK cells. The largest number of these encoded surface proteins, including the unusual lectinlike receptors NKG2E and Ly-49L, several killer cell Ig like receptors (KIRs), the integrin subunits α^D , α^X , $\beta 1$, and $\beta 5$, and multiple tetraspanins (CD9, CD151, CD53, CD63, and TSPAN-5).

Perforin and granzymes A and B, effector molecules of NK cell cytotoxicity, are also overexpressed by dNK cells. dNK express perforin, granzymes A and B and the activating receptors NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, and 2B4 as well as LFA-1. Even though they are granular and express the essential molecules required for lysis, fresh dNK cells displayed very reduced lytic activity on classical MHC I negative targets K562 and 721.221, ~15% of that of peripheral NK cells. dNK cells formed conjugates and activating immune synapses with 721.221 and K562 cells in which CD2, LFA-1 and actin were polarized toward the contact site. However, in contrast to peripheral NK cells, they failed to polarize their microtubule organizing centers and perforin-containing granules to the synapse, accounting for their lack of cytotoxicity.

Additionally, Galectin-1, PSG11 and PP14, three secreted proteins with immunomodulatory function, were among the genes over-expressed by dNK cells. Galectin-1 is a lectin with high affinity for poly-N-acetyllactosamine moieties. It has the capacity to induce apoptosis of activated CD8 T cells and, as described here, of NK cells. Western blot and ELISA assays show that galectin-1 is expressed and secreted by dNK but not by pNK cells. Annexin V staining and TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling) of freshly isolated decidual lymphocytes reveal a population of apoptotic CD3+ T cells. Conditioned media from dNK cells induced apoptosis of PHA activated peripheral T cells and a T cell line (MOLT4). The pro-apoptotic activity of dNK cells conditioned media is blocked with lactose, a disaccharide that competes the binding of galectin-1 to its polylactosamine ligands and blocks galectin-1 apoptotic activity, suggesting that dNK cells can contribute to fetal-maternal tolerance by galectin-1 secretion among other mechanisms.

Key Words: pregnancy, fetal-maternal relations, natural killer cells, gene expression profiling, lymphocyte subsets, microtubule organizing center, perforin, galectin-1, apoptosis, immunotolerance, uterus, decidua

Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente a Jack Strominger por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo, por su continuo interés y apoyo.

A Su por apoyarme en el tiempo que tomó desarrollar esta tesis, y a Eyal en particular en el último año.

Mi agradecimiento también a los miembros del laboratorio Strominger

A Eduardo Arzt (Archi) por seguir desde Buenos Aires la evolución de esta tesis como consejero de estudios.

A Linda Baum y Gabriel Rabinovich por la provisión de galectina 1 recombinante utilizada en experimentos presentados en esta tesis

Estoy también agradecido a Peter Park del Programa de Bioinformática del Children's Hospital de Boston, a Sung Choe del grupo de George Church, y a Jennifer Couget del centro Bauer de Estudios Genómicos de Harvard por guiarme en el análisis y producción de datos con microarrays.

A Su y a Eyal

Capítulo 1: Introducción.....	10
1.1 La Interfase Materno-Fetal.	10
1.2 Células Natural Killer	14
1.3. Células Natural Killer y Embarazo	19
1.4. Mecanismos de Inducción de Tolerancia Materno-Fetal	21
1.5 Objetivos	23
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	25
2.1. Aislamiento de células NK de decidua y NK periféricas para obtención de ARN , análisis por FACS, Western Blot y producción de medios condicionados.	25
2.2. Aislamiento de células NK de decidua y células NK periféricas para ensayos de citotoxicidad, microscopía confocal y análisis de la expresión de receptores activadores por FACS.	25
2.3. Simulación de aislamiento de células pNK como si fueran dNK .	26
2.4. Citometría de flujo.	26
2.5. Microscopía confocal.	27
2.5.1 Formación y análisis de conjugados.	27
2.6. Ensayos de citotoxicidad	29
2.7. Preparación de RNA marcado e hibridación de microarrays.	29
2.8. Análisis de los datos obtenidos con los microarrays.	31
2.8.1. Agrupación de muestras.	31
2.8.2. Identificación de genes con expresión diferencial.	31
2.9. RT-PCR	32
2.10 Western Blot	33
2.11. Medios condicionados por células dNK o pNK.	34

2.12 Ensayos de ELISA	34
2.13 Inducción de apoptosis por medios condicionados por células dNK y galectina 1	35
2.14. Ensayos de TUNEL	35
2.15. Inhibición de citotoxicidad de células pNK por galectina 1	36
Capítulo 3: Las células dNK constituyen un subgrupo con potencial inmunosupresor.....	37
3.1 Introducción : Células NK de decidua y células NK periféricas de sangre	37
3.2 Comparación de los perfiles de expresión de células dNK y pNK humanas por análisis con microarrays	39
3.2.1. Proteínas de membrana sobre-expresadas en células dNK	47
3.2.1.1. Tetraspaninas e Integrinas	47
3.2.1.2. Receptores de tipo lectina	48
3.2.1.3. KIRs	49
3.2.2. Moléculas con potencial inmunosupresor	50
3.2.2.1. Galectina 1 y Core 2 β -1,6- N-acetylglucosaminyl Transferasa (C2GNT)	50
3.2.2.2. PP14 o Glicodelina A (GdA)	56
3.2.3. Moléculas efectoras: Granzimas y perforina	57
3.2.4. Otras Moléculas	59
Capítulo 4: Las células dNK forman sinapsis activadoras inmaduras y son no citotóxicas.....	62
4.1. Introducción: Sinapsis activadoras y sinapsis inhibidoras	62
4.2. Las células dNK expresan receptores activadores pero su actividad citotóxica esta drásticamente reducida	63
4.3. Las células dNK forman conjugados con las células blanco pero fallan en la polarización de gránulos citotóxicos hacia el punto de contacto con las células blanco	66

4.4. Las células dNK forman sinapsis inmunológicas inmaduras	71
4.5. Discusión	75
Capítulo 5: Galectina 1 y tolerancia materno-fetal.....	79
5.1. Introducción. Galectina 1, implantación e inmunosupresión.	79
5.2. Las células dNK expresan y secretan galectina 1	81
5.3. Efectos de galectina 1 sobre células NK	84
5.4. Anexina V revela una población apoptótica de linfocitos T de decidua humana	89
5.5. Medio condicionado por células dNK induce apoptosis sobre células T activadas y células MOLT4	89
5.6. Discusión	94
6. Conclusiones.....	96
7. Referencias	98

Capítulo 1: Introducción.

El embarazo es inmunológicamente único. Representa la única situación natural en la que un cuerpo humano contiene tejido extraño de otro cuerpo humano. De hecho la mitad de todos los genes expresados por el feto son de origen paterno, incluyendo los antígenos de histocompatibilidad. El paralelismo con el trasplante de órganos fue señalado hace aproximadamente 50 años por Medewar (Medewar, 1953). El “halo trasplante fetal” sin embargo no es rechazado por el sistema inmune materno y los mecanismos que permiten la inmuno-protección del feto recién comienzan a ser comprendidos.

1.1 La Interfase Materno-Fetal.

En el sexto a séptimo día post-ovulación, el embrión se implanta en la cobertura interna del útero materno, el endometrio. El blastocisto se cubre de una capa de células de origen fetal extraembrionario denominado trofotodermo. Durante el embarazo los trofoblastos, derivados del trofotodermo, establecen todo contacto con el tejido y sangre maternos (ver figura 1.1). El tejido fetal extraembrionario forma proyecciones denominadas vilos que contienen trofoblastos vilares (de allí su denominación). Las células en la superficie de los vilos se fusionan formando un sincicio. La capa de trofoblastos vilares sinciciales, o sincicotrofoblastos, es bañada por sangre materna constituyendo la superficie de intercambio gaseoso y de nutrientes materno-fetal. Algunos vilos se anclan a la pared uterina y de ellos se desprenden citotrofoblastos extravilares que invaden la decidua materna, sus arterias, e inclusive el músculo uterino. La invasión por los trofoblastos lleva a una extensa remodelación de las arterias espiraladas maternas locales resultando en una perfusión apropiada de la placenta con sangre materna (Cross et al 1994, Loke y King 1995).

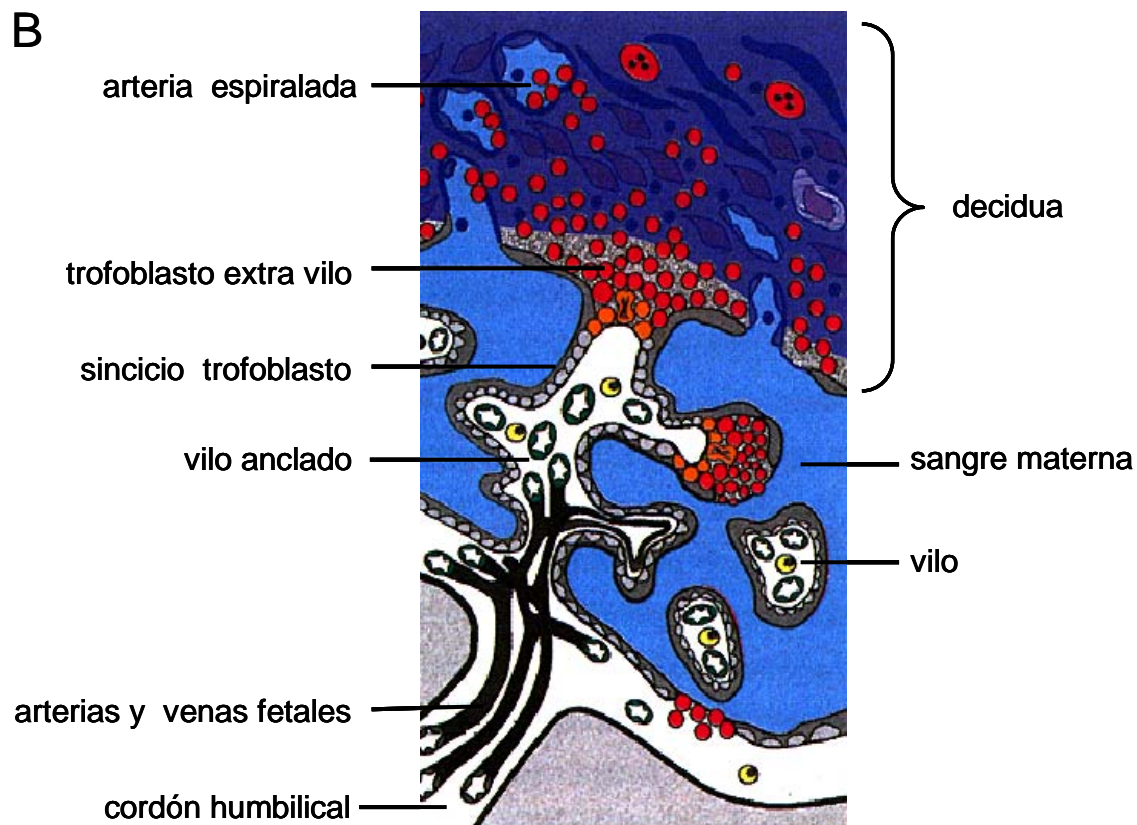
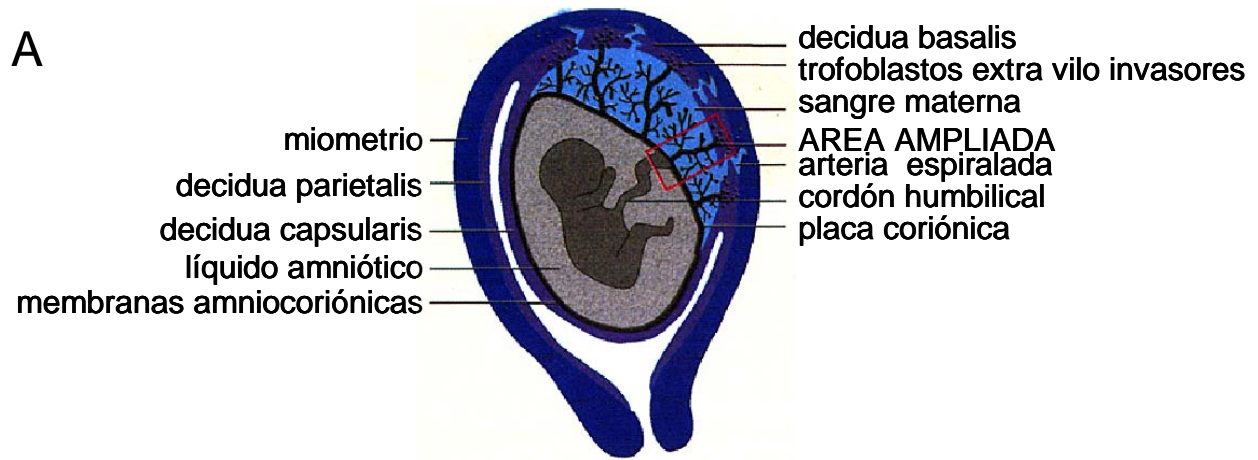


Figura 1.1 Interfase materno-fetal.

a) El feto, bañado en líquido amniótico se encuentra dentro de las membranas amniocoriónicas de origen fetal. En estas membranas, los citotrofoblastos están en contacto estrecho con la pared uterina modificada o decidua.

b) En las zonas próximas al sitio de implantación, vilos recubiertos de sinciciotrofoblastos entran en contacto con sangre materna conformando el principal sitio de intercambio gaseoso y de nutrientes. Se muestra un vilo anclado desde el cual citotrofoblastos extravilares (células rojas) invaden la decidua materna y las arterias espiraladas. La decidua esta densamente infiltrada por leucocitos maternos (células púrpura). Los tejidos de origen materno se muestran en azul o púrpura. Los tejidos de origen fetal se muestran en gris o rojo.

Figura adaptada de LeBouteiller et al 1999

La decidua materna está formada por varios tipos celulares incluyendo células de estroma pobremente caracterizadas, y células epiteliales glandulares. Interesantemente el tejido endometrial tanto de úteros gestantes como de úteros no gestantes contiene leucocitos. Más aún, durante el embarazo temprano, el número de leucocitos se incrementa significativamente en el sitio de implantación. Estudios inmunohistológicos y de citometría de flujo han mostrado que los leucocitos deciduales consisten aproximadamente de 70 % de células Natural Killer (NK), 10% de células T, y 20 % de macrófagos. Las células B y los granulocitos son raros (Loke y King 1995).

Las células NK del endometrio parecen estar bajo control hormonal. Durante los 9 días de la fase proliferativa del ciclo menstrual que preceden a la ovulación el endometrio se torna altamente vascularizado e infiltrado por células NK (Bulmer et al 1987, King et al 1989). La ovulación marca el comienzo de la fase secretoria. Esta dura 14 días durante los cuales las células NK proliferan. Durante esta fase es que el embrión puede implantarse, si esto no ocurre las células NK mueren y se pierden con el endometrio externo durante la menstruación. En la eventualidad de producirse un embarazo las células NK son retenidas y aumentan en número durante el embarazo temprano. De hecho, si se consideran todos los tipos celulares que forman el tejido de la decidua humana, las células NK representan el 30 % de todas las células, y son aún más abundantes en el sitio de implantación en contacto estrecho con los trofoblastos extravilares. A pesar de ser tan abundantes, se desconoce su función en relación al embarazo.

Las células NK persisten en la decidua hasta al menos el segundo trimestre del embarazo, pero están prácticamente ausentes al término del mismo (King et al 1996 a). Poseen un fenotipo particular (CD56^{brillante} CD16⁻) similar a un pequeño subgrupo de células NK circulantes en sangre. Interesantemente las células NK de decidua expresan marcadores de activación como CD69 y son teñidas con el marcador de proliferación KI-67. Tienen morfología granular conteniendo gránulos

de perforina y granzimas (King et al 1996 a). Estas células parecen poseer características de células NK con un fenotipo activado. Estas y otras características de las células NK de decidua se discuten más extensamente en el capítulo 3 de esta tesis.

Las células T ($CD3^+$) son mucho menos abundantes en el endometrio. A diferencia de las células NK, su número permanece relativamente constante durante el ciclo menstrual y el embarazo temprano. Interesantemente las células T de decidua también expresan CD69 y aproximadamente el 50% son HLA-DR+. Son en su mayoría $CD45RO$, indicando un fenotipo de memoria activado (Loke y King, 1995).

Los macrófagos ($CD14^+$) están presentes en el endometrio de úteros no gestantes, y son reclutados en gran número a al sitio de implantación durante el embarazo. Estas células parecerían tener muchas características de los macrófagos de tejidos (Loke y King, 1995).

Por lo tanto, al invadir la decidua, los trofoblastos extravilares entran en contacto físico directo con diversos tipos de células inmunes maternas. Esto genera el interrogante de cómo se evita el rechazo de los trofoblastos fetales al ser estos extraños a la madre. Los trofoblastos extravilares se caracterizan por no expresar las moléculas clásicas de histocompatibilidad de clase I HLA-A o -B o moléculas MHC de clase II (Cross et al, 1994, LeBouteiller et al, 1996). Esto podría evitar el reconocimiento directo por células T que interactúan con moléculas MHC clásicas. Similarmente disminuye también el potencial de presentar antígenos menores de histocompatibilidad fetales. Sin embargo los menores niveles de MHC expresados podrían hacer susceptibles a los trofoblastos del reconocimiento por las células NK maternas (ver más abajo). Los trofoblastos extravilares expresan sin embargo las moléculas HLA-G, HLA-E y HLA-C y se ha sugerido que las mismas podrían jugar un papel en la inhibición de los leucocitos maternos.

1.2 Células Natural Killer

El conocimiento acumulado sobre células NK surge principalmente del estudio de células NK circulantes en sangre, denominadas células NK periféricas (pNK). Las células NK son linfocitos que, a diferencia de los linfocitos B o T, son específicamente activadas o inhibidas mediante receptores codificados en el ADN germinal y son por tanto parte del sistema inmune natural (Raulet D.H. 2004). Morfológicamente la mayor parte de las células NK son linfocitos granulares grandes de mayor tamaño que los linfocitos normales y poseen un citoplasma más extenso. Fenotípicamente las células NK humanas son identificadas por ser CD3⁻, CD56⁺.

Las funciones efectoras de las células NK incluyen citotoxicidad, secreción de citoquinas y quemoquinas, y coestimulación dependiente de contacto celular.

Las células NK pueden matar células infectadas por virus y células tumorales (Hokland M. y Kuppen, 2005). Poseen un gran número de gránulos citolíticos conteniendo perforina y granzimas. Al entrar en contacto una célula NK con una célula blanco, estos gránulos se trasladan a la zona de contacto con la célula blanco (llamada sinapsis inmunológica) y los contenidos son liberados para efectuar la lisis direccional de la célula blanco. La citotoxicidad mediada por perforina es el principal mecanismo de lisis de las células NK, aunque también pueden matar de manera perforina independiente utilizando el ligando de FAS (FASL), TNF o el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) (Zamai et al 1998)

Las células NK pueden secretar interferón gama (IFN- γ) al ser activadas, pero también producen TNF- α , GM-CSF, IL-5, IL-13, MIP1 (α y β) y RANTES (Loza et al 2002, Dorner et al 2004, Robertson 2002). La actividad citotóxica y la secreción de citoquinas / quemoquinas es

mediada por distintos subgrupos de células NK caracterizadas por distintos niveles en la expresión de CD56 (ver capítulo 3).

Las células NK expresan varios ligandos de coestimulación incluyendo CD40L (CD154) y OX40L que les permite proveer señales coestimuladoras a células T o B (Zingoni et al 2004, Blanca et al 2001). Por lo tanto las células NK pueden funcionar también como un puente entre las respuestas inmunes natural y adquirida.

La capacidad citotóxica de las células NK ha dado lugar a cuestionar como es que se evita la actividad de células NK contra células autólogas. En su tesis doctoral, Klas Karre propuso la hipótesis de “falta de lo propio” (Ljunggren y Karre 1990). Esta hipótesis sostiene que las células NK son capaces de matar células autólogas, pero son activamente inhibidas de hacerlo por receptores inhibidores que las reconocen como propias. Siendo “lo propio” definido por la presencia de moléculas de MHC de clase I , la hipótesis sostiene que moléculas propias de MHC interactúan con receptores inhibidores en la superficie de las células NK previniendo la transmisión de señales líticas.

Esta hipótesis ha sido sustanciada por el descubrimiento de los receptores inhibidores de células killer de tipo inmunoglobulina (KIRs) (Moretta et al 1993) y varias familias de receptores activadores (Lanier 2005). A diferencia de los receptores T o B, la determinación de la especificidad de estos receptores no requiere de recombinación genética. El modelo actual de activación e inhibición de células NK se basa en el balance de la función de receptores activadores e inhibidores específicos. Si el balance favorece a las señales inhibitorias, entonces los eventos intracelulares que desencadenan las funciones efectoras no han de prosperar. Si el balance favorece a las señales

activadoras, la célula NK progresa por una serie de procesos intracelulares y puntos de control para ejercer las funciones efectoras (Wulfig et al 2003).

Dos grupos principales de receptores inhibidores son expresados por las células NK. Estos son receptores pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas (receptores tipo inmunoglobulina de células killer o KIR , transcriptos tipo inmunoglobulina o ILT y receptores de leucocitos tipo inmunoglobulina o LIR) y receptores tipo lectinas (NKG2A, NKG2B, KLRG1) (Tomasello et al 2000). Estas moléculas, en su mayoría, reconocen con distintas especificidades moléculas MHC de clase I clásicas (HLA-A , B o C) o no clásicas (HLA-E o G).

Adicionalmente existen otros receptores inhibidores de células NK como CD66a (Moller et al 1996, Markel et al 2002), Siglec7 (Nicoll,1999) sin ligandos conocidos que podrían participar en la modulación de respuestas NK contra células que no expresan moléculas MHC de clase I. Tal es el caso de KLRG1 que tiene como ligando a diversas cadherinas (E-, N- y R-) (Ito et al 2006). Mientras que el rol fisiológico de los receptores inhibidores con afinidad por moléculas MHC es claro , el rol fisiológico de estos otros receptores aún debe establecerse (Lanier 2005).

Prácticamente todos los receptores inhibidores bien definidos se caracterizan por tener en su dominio citoplasmático al menos un motivo inhibidor basado en inmuno tirosinas (ITIM) constituido por los residuos Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val . Al activarse el receptor la tirosina es fosforilada facilitando el reclutamiento de fosfatasas conteniendo dominios SH2 que a su vez quedan a cargo de transducir la señal inhibitoria (Lanier 2005).

De acuerdo al modelo vigente, la activación de las células NK se da cuando receptores activadores unen a sus ligandos y proveen señales activadoras que superan el umbral que las señales

inhibidoras definen. Los receptores activadores son estructuralmente diversos, sin embargo tienen en común que, en su mayoría, para transducir sus señales utilizan proteínas adaptadoras conteniendo motivos de activación basados en inmunotirosinas (ITAM) definidos por la secuencia Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu/Ile_{x6-8} Tyr_{xx} Leu/Ile (Reth M., 1989). Las células NK expresan tres proteínas adaptadoras conteniendo ITAMs: FcεRIγ (Hibbs et al, 1989), CD3ζ (Anderson et al, 1989), y DAP12 (Lanier et al, 1998 a) también conocida como KARAP (Olcese et al 1997). Las tirosinas de los ITAMs son fosforiladas permitiendo el reclutamiento de las tirosin kinasas Syk y ZAP70 a través de sus dominios SH2 las que a su vez desencadenan eventos río abajo causando influjo de Ca²⁺, degranulación y transcripción de genes de citoquinas y quemoquinas (Lanier 2005).

Algunos ejemplos de receptores activadores expresados por células NK humanas son:

- CD16, fue el primer receptor activador de células NK en ser identificado. Es un receptor de baja afinidad para la región FC de inmunoglobulina G (IgG) y media la activación de células NK dependiente de anticuerpos (ADCC) (Dall'Ozzo, et al 2004).
- Receptores de citotoxicidad natural (NCR) incluyendo a NKp30, NKp44, NKp46 y NKp80 parecen ser solo expresados por células NK (Biassoni et al 2001). NKp44 y NKp46 pueden unir la proteína hemaglutinina del virus influenza y por lo tanto pueden jugar un papel en la defensa contra este virus (Mandelboim et al 2001, Arnon et al 2001, Cantoni et al, 2003).
- El receptor 2B4 (CD244) tiene por ligando a CD48 (Brown et al 1998, Latchman et al 1998). Ambas proteínas son miembros de la familia CD2 de proteínas relacionadas a inmunoglobulinas. 2B4 posee 4 motivos Thr-x-Tyr-x-x-Leu/Ile en su dominio citoplasmático y media su activación uniéndose a la proteína adaptadora SH2D1A (Tangye et al 1999, Nakajima et al 2000, Parolini et al 2000) CD48 es inducida en células infectadas por el virus Epstein Barr (EBV) por lo que 2B4 puede ser importante en la defensa contra EBV (Fisher et al 1991). Defectos en la funcionalidad de 2B4 han

sido ligados al síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X que se caracteriza por una alta susceptibilidad a infecciones con EBV (Nakajima et al 2000, Parolini et al 2000).

- DNAM-1 (CD226) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y tiene por ligandos a CD112 o el receptor de polio virus (PVR) y a CD155 o nectina-2 (Shibuya et al 1996, Bottino et al 2003, Tahara-Hanahoka et al 2004). Estos ligandos son expresados en un gran número de tejidos, los que se ven protegidos de la acción de las células NK por la expresión de moléculas MHC de clase I. Células tumorales sobre expresan los ligandos de DNAM-1 a la vez que reducen el nivel de expresión de moléculas MHC de clase I como mecanismo de evasión a repuestas T citotóxicas (Masson et al 2001, Bottino et al 2003, Tahara-Hanahoka et al 2004). La interacción de DNAM-1 con ellos aumenta la actividad citotóxica de las células NK como también la producción de citoquinas por las mismas.
- NKG2D es una glicoproteína transmembrana de tipo 2 expresada por todas las células NK y células $\gamma\delta T$ CD3⁺ humanas (Bauer et al 1999, Jamieson et al 2002) como homodímero unido por puentes disulfuro. Utiliza a DAP10 como molécula adaptora (Billadeau D 2003). La estimulación de células NK por NKG2D dispara su actividad citotóxica y a veces la secreción de citoquinas y quemoquinas. NKG2D une a una familia de ligandos con homología estructural a moléculas MHC de clase I que carecen de un sitio de unión para péptidos (Radev y Sun 2003). Los ligandos en humanos son MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, y ULBP4 (Bauer et al 1999, Cosman et al 2001, Jan Chalupny et al 2003). NKG2D ha sido implicada en respuestas NK contra tumores e infecciones virales. Se ha observado que células sometidas a stress incrementan la expresión de ligandos de NKG2D y por ende la susceptibilidad a la citotoxicidad por células NK (Bauer et al 1999, Gasser et al 2005). La importancia de las respuestas citotóxicas mediadas por NKG2D es tal que virus como MCV han desarrollado mecanismos de escape expresando la proteína viral UL16 que secuestra intracelularmente los ligandos de NKG2D ULBP1, ULBP2 y MICB (Wu et al 2003).

Welte et al 2003) Algunos tumores inclusive secretan formas solubles de los ligandos para prevenir el ataque por células NK (Groh et al 2002, Doubrovina et al 2003. Salih et al 2002) .

- Algunos receptores KIR que carecen de ITIMS funcionan como receptores activadores (ver más abajo).

1.3. Células Natural Killer y Embarazo.

La abundancia de células NK en la decidua humana ha llevado a postular que las mismas han de cumplir un rol en el mantenimiento y desarrollo de un embarazo exitoso. De hecho alotipos de receptores KIR de células NK han sido asociados a anomalías reproductivas (Hibby et al 2004) .

Los receptores KIR son nombrados de acuerdo al número de dominios tipo Ig extracelulares (por ejemplo KIR2D tiene 2 dominios Ig, KIR3D tiene 3 dominios Ig) y a las características del dominio citoplasmático: L si es largo y contiene ITIMS y por lo tanto media respuestas inhibitorias, y S si es corto y no contiene ITIMS y no media respuestas inhibitorias sino activadoras. Características adicionales del dominio citoplasmático permiten identificarlos de acuerdo a 5 colas citoplasmáticas lo que se indica con un número al final de la denominación. Así KIR2DL1 posee 2 dominios Ig extracelulares y un dominio citoplasmático largo de tipo 1 (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html>). Un caso particular lo constituye el receptor KIR2DL4 que funciona tanto como receptor activador con respecto a la secreción de citoquinas e inhibidor con respecto a la citotoxicidad de las células NK.

Los receptores KIR se encuentran codificados en el cromosoma 19q13. El locus KIR consiste de 7 a 15 genes y forman numerosos haplotipos que se diferencian en el contenido de genes y en la combinación de alelos. Se han descrito más de 100 haplotipos KIR. Los haplotipos KIR pueden agruparse en 2 grupos, denominados A y B basándose en el contenido de genes que codifican para

KIRs inhibidores y KIRs activadores. El grupo de haplotipos más simples, el grupo A, contiene principalmente genes para KIR inhibidores, mientras que el grupo B, más complejo, posee genes adicionales que codifican para KIRs activadores (Uhrberg et al 1997).

La preeclampsia es una patología de la reproducción humana que puede ser generada por la remodelación incompleta de las arterias espiraladas deciduales, resultando en un incremento de la presión sanguínea y proteinuria maternas (Redman y Sargent 2003, Walker 2000). La preeclampsia puede evolucionar en eclampsia poniendo en riesgo la vida tanto de la madre como del feto. El único tratamiento conocido es la inducción del parto, o la práctica de una cesárea que los médicos deben decidir cuando realizar balanceando las necesidades vitales de la madre y del feto (Walker 2000).

Estudios recientes han implicado a alotipos de HLA-C en los trofoblastos fetales y KIR en las células NK de decidua maternas como factores que afectan el riesgo de preeclampsia en un embarazo. Preeclampsia es más prevalente en mujeres que son homocigotas para el grupo A de haplotipos KIR y por tanto carecen de KIRs activadores (Hiby et al 2004). Por otra parte desde el punto de vista de la especificidad de los receptores KIR, los alotipos de HLA-C forman 2 grupos: los alotipos del grupo C1 tienen asparagina en la posición 80 de la secuencia aminoacídica y son ligandos de KIR2DL2 y KIR2DL3. Los alotipos del grupo C2 tienen lisina en la posición 80, y son ligandos del receptor inhibidor KIR2DL1 y del receptor activador KIR2DS1 (Colonna et al 1993). Los alotipos C2 son ligandos más fuertes que los C1. Interesantemente, la mayor prevalencia de preeclampsia en mujeres KIR AA se debió exclusivamente a embarazos en los que el genotipo del feto es C2 homocigota o C1C2 heterocigota. La combinación de HLA-C2 fetal y KIR-AA materno da lugar señales inhibitorias más fuertes dado que las células NK maternas de genotipo AA expresan el receptor de C2. KIR2DL1, pero no expresan receptores activadores KIR2DS1 que puedan compensar las señales inhibitorias. También se observó que en los embarazos con fetos C2 homo o

heterocigotas, los receptores KIR activadores disminuyen el riesgo de preeclampsia (Hiby et al 2004). Se ha propuesto un modelo por el cual la preeclampsia estaría asociada a una inhibición exagerada de las células NK. Contrariamente otros estudios muestran que la inhibición insuficiente de las células NK de decidua favorece la predisposición a abortos espontáneos recurrentes, otra patología del embarazo (Varla-Leftherioti et al 2003).

Por tanto pareciera ser que las células NK están activamente involucradas en el mantenimiento de un embarazo exitoso y que un balance apropiado de su activación e inhibición es importante para lograrlo. A pesar de ello se desconocen las funciones que cumplen las células NK en la decidua humana y cómo se previene el rechazo del feto por parte de las células del sistema inmune materno presentes en la interfase materno fetal.

1.4. Mecanismos de Inducción de Tolerancia Materno-Fetal

Una serie de mecanismos para la inducción de tolerancia de tolerancia materno-fetal han sido propuestos recientemente:

La transfección de líneas celulares blanco clásicas de células NK con HLA-G o HLA-E protege a las células transfectantes de la actividad citotóxica de células NK obtenidas de sangre (Mandelboim et al 1997, Braud et al 1998,) Por extensión , se ha propuesto que la expresión de estas moléculas por los trofoblastos fetales constituye un mecanismo de evasión a la actividad citotóxica de las células NK de decidua. Sin embargo los estudios conducentes a esta conclusión fueron realizados con células NK periféricas, que como se discute en los capítulos 3 y 4 difieren fenotípicamente de las células NK de decidua.

Se han sugerido también una serie de mecanismos conducentes a la inducción de tolerancia contra respuestas mediadas por células T en la interfase materno-fetal.

La expresión de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) por trofoblastos y células de decidua induce la expresión de FAS-L en trofoblastos los que a su vez inducen apoptosis de células T activadas. El tratamiento de ratas con antalarmin, un antagonista del receptor de CRH redujo el número de embriones por rata en cruces alogeneicos pero no en cruces singeneicos (Makrigiannakis et al 2001).

Por otra parte A. Mellor ha propuesto que la placenta afecta a las células T hambreándolas. Células de la placenta expresan la enzima indoleamina 2,3-deoxygenasa (IDO) que cataboliza el aminoácido triptofano. La expresión de IDO en la placenta depletaría localmente la disponibilidad de triptofano requerido por las células T activadas. El suministro de inhibidores de IDO a ratones produjo el rechazo de fetos en cruces alogeneicos pero no en cruces singeneicos. El inhibidor generó inflamación en la interfase materno-fetal caracterizada por la deposición de complemento (Munn et al 1998, Mellor et al 2001). Se ha demostrado también que catabolitos de triptofano río abajo de IDO inhiben la proliferación de células T y NK (Frumento et al 2002).

Otro gen que ha sido involucrado en la inducción de tolerancia materno-fetal a través de la regulación de respuestas T es el ligando de muerte programada 1 (PDL1), una molécula coestimuladora de la inhibición de respuestas T. Ratones hembras deficientes en PDL1 mostraron una supervivencia fetal reducida en cruces alogeneicos respecto a cruces singeneicos, que estuvo asociada a una expansión de respuestas de tipo Th 1 (Guleria et al 2005).

La regulación del complemento también parece ser importante en el control del rechazo del feto. En tal sentido la expresión del gen *Crry*, un inhibidor de complemento, por el tejido fetal de ratón es necesario para evitar el rechazo del implante fetal (Xu et al 2000).

Recientemente células T regulatorias han sido implicadas en tolerancia materno-fetal. El número de esplenocitos $CD4^+ CD25^+$ y el nivel de mensajeros para FOXP3 en la decidua de ratón se incrementa durante el embarazo independientemente de que sea el resultado de cruces singéneos o alogéneos. Sin embargo las células $CD4^+ CD25^+$ son importantes para el desarrollo de embarazos exitosos en cruces alogéneos. La transferencia de esplenocitos a ratones nude hembra resulta en progenes reducidas en número si las células transferidas son depletadas de células $CD4^+ CD25^+$ (Aluvihare et al 2004)

1.5 Objetivos .

La inmunotolerancia materno-fetal y la paradójica abundancia de células NK presentes en la decidua humana, que a pesar de contener gránulos citotóxicos no rechazan a los trofoblastos fetales, han servido de inspiración a esta tesis. Estudios precedentes indican que las células dNK están activamente involucradas en el mantenimiento del embarazo , sin embargo la limitada caracterización de las mismas no permite establecer claramente su función en la decidua . Con el objeto de realizar una caracterización más extensa de las células dNK e identificar genes que provean indicios de su función, en esta tesis se examina a las células dNK a través de la comparación de sus perfiles de transcripción ex-vivo con los perfiles de transcripción de células pNK utilizando microarrays de oligonucleótidos. El análisis sugiere que las células dNK constituyen un grupo distinto de las células pNK expresando diferencialmente un número de genes que codifican proteínas inmunosupresoras con un posible rol en la inducción de tolerancia materno-fetal. Se evaluó cuidadosamente la actividad citotóxica de las células dNK y su capacidad de formar sinapsis inmunológicas activadoras. Una de

las proteínas inmunosupresoras secretadas por las células dNK es galectina 1. Se estudiaron sus efectos sobre células NK como también los efectos de galectina 1 secretada por las células dNK sobre células T, proponiéndose la contribución por parte de las células dNK a la generación de un ambiente inmunoprivilegiado en la decidua, que prevenga el rechazo del feto por parte del sistema inmune de la madre

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1. Aislamiento de células NK de decidua y NK periféricas para obtención de ARN , análisis por FACS, Western Blot y producción de medios condicionados.

Tejidos de decidua fueron lavados con PBS conteniendo gentamicina 50 µg/mL y luego disgregados con tijeras estériles. Los linfocitos de decidua fueron liberados por la digestión del tejido con 0.1% colagenasa tipo 4 y 0.01% DNAsa (ambas de Sigma Aldrich) durante 30 minutos a 37°C en medio RPMI 1640. Se dejó adherir las células de estroma y macrófagos a placas de cultivo por 2 hs a 37°C en una atmósfera conteniendo 5% CO₂. Los linfocitos en suspensión fueron luego purificados con un gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque; Amersham Biosciences) , teñidos y analizados o separados por FACS. Los linfocitos periféricos fueron aislados de sangre usando Ficol en forma directa o tras el enriquecimiento de células NK utilizando Rosettesep siguiendo las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies Inc.)

2.2. Aislamiento de células NK de decidua y células NK periféricas para ensayos de citotoxicidad, microscopía confocal y análisis de la expresión de receptores activadores por FACS.

Las células NK de decidua fueron aisladas en forma similar a como e describe en 2.1 a excepción de que el enriquecimiento en células dNK se raelizo depletando células CD3⁺ y CD16⁺ con esferas inmuno-magneticas (Miltenyi Biotec). En este punto las células dNK se utilizaron en microscopía confocal o fueron aisladas con esferas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos contra CD56 y utilizadas en ensayos de citotoxicidad o cultivadas en presencia de 12 ng/mL IL-15.

Las células NK periféricas de sangre utilizadas en microscopía confocal fueron aisladas como se describe en 2.1 sólo que la remoción de células CD3⁺ se realizó mediante el uso de micro esferas inmunomagnéticas. Para los ensayos de citotoxicidad las células pNK fueron subsecuentemente purificadas utilizando micro esferas inmuno-magnéticas cubiertas con anticuerpos contra CD56.

2.3. Simulación de aislamiento de células pNK como si fueran dNK .

Células pNK enriquecidas con RosetteSep (Stem Cell Technologies) fueron expuestas al protocolo utilizado para el aislamiento de células dNK.

2.4. Citometría de flujo.

En el análisis por FACS se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón , purificados o conjugados con fluoresceína isothiocyanato (FITC), phycoeritrina (PE) , Cychrome (Cy) o Aloficocianina (APC): anti-CD3, anti-CD56, anti-CD16, anti-CD9, anti-KIR2DL1/S1, (CD158a; EB6), anti-KIR2DL2/2DS2/2DL3 (CD158b; GL183),y anti-KIR3DL1 (CD158e; NKB1), todos de BD Biosciences, anti CD62L (Dako Cytomation); anti-NKG2D (R&D Systems). Anti-NKp30, anti-NKp44, anti-NKp46, y anti-2B4 todos de Beckman Coulter; anti KIR2DL4 (anticuerpos monoclonales 33, 36, 64 fueron provistos por E.Long [National Institutes of Health, Bethesda, MD , Rajagopalan et al 2001]), e IgG e IgM controles isotípicos (BD Biosciences). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron F(ab)₂ de IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC o PE (Caltag). Para la tinción y separación, las células se lavaron con PBS conteniendo 2 % FCS y se incubaron con el anticuerpo monoclonal (mAb) por 30 min en hielo , para luego ser lavadas con PBS 2%FCS. Se tomaron las mediciones fluorométricas de 10000 células usando un citómetro de flujo FACScalibur (Immunocytometry Systems: Becton Dickinson). Los datos se analizaron con CellQuest (Becton Dickinson) o Flow Jo (Treestar).

Para el análisis de la expresión de receptores activadores los histogramas se obtuvieron tras establecer filtros para células $CD56^{\text{brillante}} CD3^{-}$ en el caso de células dNK y $CD56^{\text{tenue}} CD3^{-}$ para células pNK.

2.5. Microscopía confocal.

Para los estudios de microscopía confocal se utilizaron los siguientes anticuerpos y reactivos fluorescentes: anti-CD2 conjugado con FITC (RPA-2.10), anti-CD11a (anti-cadena α de LFA-1) (HI111), control IgG1 κ (MOPC-21), (todos de BD Biosciences), Anti- γ tubulina (GTU-88) (Sigma), anti α -tubulina biotilado, cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluo 568 o Alexa Fluo 647 y estreptavidina conjugada con Alexa Fluo 568, todos de Invitrogen. F-actina fue detectada con faloidina conjugada con Alexa Fluo 647 o Alexa Fluo 568 (Invitrogen). Anti-perforina (G9) purificado o conjugado con FITC e IgG2b de BD Biosciences.

2.5.1 Formación y análisis de conjugados.

Células dNK y pNK se conjugaron con células 721.221, 721.221/4C4 HLA-G (721.221 transfectadas con HLA-G) (Mandelboim et al 1997), K562, BeWo, JEG3 o YTS en una proporción 2 a 1 en suspensión en medio RPMI 10 % FCS durante 15 min a 37°C. Para los conjugados en los que los microtúbulos de las células NK fueron teñidos, las células 721.221 o K562 fueron pretratadas con colchicina 10 mM (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de formar conjugados a fin de facilitar la visualización del citoesqueleto de microtúbulos de las células NK. Las células fueron luego incubadas a 37°C durante 15 minutos sobre slides cubiertos con poli-L-lisina (Sigma) y fijadas con formaldehído 4% en PBS. En los casos en que se realizó tinción de LFA-1 los conjugados fueron expuestos a los respectivos anticuerpos primarios contra LFA-1 y secundarios antes de proceder a la permeabilización de las células. Las células fueron permeabilizadas en los slides con 0.1% saponina, y 0.1% Triton X-100 en PBS por 15 min. Los

slides se lavaron con PBS conteniendo 0.1% saponina y luego se tiñeron con los correspondientes anticuerpos por períodos de 1 hora a temperatura ambiente. Entre las sucesivas tinciones los slides fueron lavados con PBS conteniendo 0.1% saponina. Las tinciones se realizaron en el siguiente orden: primero anticuerpos primarios contra LFA-1, γ -tubulina o perforina (solo en los slides teñidos con anti-perforina y anti-CD2) seguido por el correspondiente anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios unidos fueron luego bloqueados con 20% suero de ratón (Sigma). En los casos en los que se tiñeron microtúbulos los slides fueron expuestos anticuerpos anti- α -tubulina biotinilados, y finalmente a estreptavidina conjugada con fluoróforos, falloidina conjugada con fluoróforos y/o anticuerpos contra perforina o CD2 conjugados con FITC. Los anticuerpos se utilizaron en el rango de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio láser de barrido confocal Zeiss LSM 510. las células dNK, pNK o YTS fueron identificadas como células perforina positivas. Para estimar el porcentaje de células dNK y pNK involucradas en la formación de conjugados, se evaluaron 70 o más células perforina positivas de campos tomados al azar.

La acumulación de moléculas en la NKIS y la polarización del MTOC y gránulos conteniendo perforina fue calculado contando al menos 50 conjugados por slide que involucraran células dNK, pNK o YTS, las que se identificaron en los conjugados como células perforina-positivas. Los porcentajes presentados son el promedio de al menos 3 experimentos independientes.

Para el análisis tridimensional y la visualización de pSMACs las imágenes se adquirieron como fue descrito (Orange et al 2002) por alineación de 16 a 20 imágenes obtenidas a intervalos de 0.5- μm en el eje z.. La reconstrucción tridimensional fue rotada y proyectada en los planos z, x o z, y visualizadas usando el software LSM 510.

Los colores mostrados en las figuras son pseudo colores.

2.6. Ensayos de citotoxicidad

La actividad citotóxica de células dNK, pNK o dNK tratadas con IL-15 sobre células blanco 721.221 o K562 se midió mediante ensayos de liberación de ^{51}Cr durante 4 hs. Las células blanco fueron marcadas por incubación por 1 h a 37°C con $100\ \mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr (Na_2CrO_4) (Perkin-Elmer) por cada 1×10^6 células, seguido de 4 lavados con medio RPMI. Las células blanco marcadas (1×10^4) fueron resuspendidas en RPMI 10% FCS, sembradas en cada well de una placa de poli estireno de 96-wells de fondo redondo (Corning), e incubadas por 4 horas a 37°C con las células NK en las proporciones célula efectora - célula blanco especificadas. La cantidad de ^{51}Cr liberado a los sobrenadantes (cpm experimentales) se midió con Lumaplates y un detector gamma TopCount XL (Packard). El porcentaje de lisis se calculó de la siguiente manera: $(\text{cpm exp} - \text{cpm liberadas espontáneamente}) / (\text{cpm totales} - \text{cpm liberadas espontáneamente})$. Las cpm totales se midieron lisando totalmente las células blanco con 1% Nonidet P-40 en agua.

2.7. Preparación de RNA marcado e hibridación de microarrays.

Las células aisladas por citometría de flujo fueron lavadas con PBS y los pellets celulares congelados en TRIZOL (GIBCO BRL). El RNA total fue aislado siguiendo las instrucciones del fabricante de TRIZOL con la adición de 5ug de poliacrilamida lineal (genelute LPA; Sigma Aldrich) para facilitar la visualización del pellet de RNA. El RNA fue luego limpiado con RNaeasy mini RNA kit (QIAGEN). La subsiguiente amplificación y limpiado de RNA fue adaptado de Baugh et al 2001. El cRNA biotinilado obtenido fue hibridizado sobre chips HGU95Av2 (Affymetrix, Inc.) conteniendo sondas para aproximadamente 10000 genes. Los chips se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante (Affymetrix, Inc.) El nivel de mensajeros se estableció con el software MAS 5.0 (Affymetrix, Inc.). En base a las matrices de decisión de Affymetrix se asignó un estado de presente (expresado) o ausente (no expresado) a cada gen. Se procesaron 9 muestras de células dNK, 5 muestras de células pNK CD56^{brillante} y 5 muestras de células pNK CD56^{tenue} como se detalla en la tabla 2.1.

Muestra N°.	Fuente (tiempo de gestación en semanas + días)	Cantidad de donantes (todos anónimos]
	dNK	
1	(11w + 3d)	Un donante
2	(8w)	Un donante
3	(11w + 3d)	Un donante
4	(7w + 1d)	Un donante
5	(7w + 5d)	Un donante
6	(7w + 1d)	Un donante
7	(8w + 1d)	Un donante
8	(6w + 2d)	Un donante
9	(5-6w)	Un donante
	pNK CD56^{brillante}	
10		Pool de 3 donantes*
11		Un donante ^
12		Un donante ^^
13		Pool de 3 donantes**
14		Un donante °
	pNK CD56^{tenue}	
15		Pool de 3 donantes*
16		Un donante ^
17		Un donante ^^
18		Pool de 3 donantes
19		Un donante °

Tabla 2.1. Muestras procesadas para la obtención de cRNA y análisis por microrrays de oligonucleótidos. * / ^ / ^^ / ° indican muestras de células pNK CD56^{brillante} y pNK CD56^{tenue} obtenidas de un mismo donante denotado por el símbolo correspondiente.

2.8. Análisis de los datos obtenidos con los microarrays.

2.8.1. Agrupación de muestras.

La agrupación de muestras se realizó con el software D-chip (<http://www.dchip.org>). Los valores de intensidad fueron normalizados por el método de modelo de expresión de base (Li y Wong 2001). Sólo se consideraron los genes con expresión variable en las 19 muestras en base a dos criterios: los genes debían ser expresados en al menos el 20 % de las muestras, y el coeficiente del desvío estándar sobre la media de la intensidad de expresión del probe-set debía ser >0.5 y < 25 . Un algoritmo de agrupamiento jerárquico no supervisado (Eisen et al 1998) fue aplicado para organizar las 19 muestras sobre la base de la similitud en sus patrones de expresión

2.8.2. Identificación de genes con expresión diferencial.

Las 19 muestras fueron normalizadas a un valor promedio (acotado usando el 95% central de las distribuciones). No se detectaron problemas de saturación u otros efectos de no linealidad. Se estableció un requerimiento de que un gen para ser considerado en el análisis debía ser expresado en al menos 5 de las 19 muestras dado que 5 es el tamaño de muestra mas pequeño, aquel de los dos subgrupos de células pNK. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a su origen biológico en dNK (9 muestras), pNK CD56^{tenue} (5 muestras) y pNK CD56^{brillante} (5 muestras) . Tres comparaciones de pares fueron realizadas (dNK vs. pNK CD56^{brillante}, dNK vs. pNK CD56^{tenue}, y pNK CD56^{brillante} vs. pNK CD56^{tenue}) usando el test T de Student con varianzas variables. Más de 1100 genes mostraron tener expresión diferencial a un valor $p \leq 0.01$ en las comparaciones que involucraban a muestras de células dNK mientras que sólo 300 tuvieron expresión diferencial en la comparación entre los dos subsets de células pNK. A fin de descartar que esto se debiera al mayor tamaño de muestra de dNK (9 muestras de células dNK vs. 5 de cada subtipo de células pNK) el análisis se repitió con todas las combinaciones posibles de 5 muestras tomadas de las 9 muestras dNK originales. Aunque el número

de genes seleccionados varió, la proporción de genes seleccionados en las comparaciones que involucran a muestras dNK en comparación con las que sólo involucran a los dos subtipos de muestras pNK se mantuvo aproximadamente 3 a 1 (Capítulo 3 Tabla 3.1).

Se detectaron 278 genes con un cambio en el nivel de expresión de al menos 3 veces y un valor $p \leq 0.001$ en al menos una de las tres comparaciones de a pares. Para los genes representados por más de un set de sondas solo se muestran los resultados correspondientes a un set de sondas representativo. Los genes se clasificaron sobre la base a información disponible en bases de datos de acceso publico: Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>), Gene Ontology Consortium functional annotations (<http://www.peneontology.org>) Locuslink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>) OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>) y PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)

Para la confección de diagramas de Venn los genes se consideraron sobre-expresados en un subtipo particular NK si mostraban un incremento significativo ($p \leq 0.001$) en al menos una de las comparaciones involucrando al subtipo particular de células NK. Los diagramas de Venn se construyeron intersectando el conjunto de genes considerados sobre-expresados en cada uno de los 3 tipos NK

2.9. RT-PCR

La RT-PCR se realizó utilizando cantidades equivalentes de RNA de las distintas muestras. Se sintetizó cDNA a partir de 300 ng de RNA total usando transcriptasa reversa Superscript II. Siguiendo el protocolo del fabricante (Life Technologies) La PCR subsiguiente se realizó con 2uL de cDNA templado en un volumen total de 50 uL conteniendo 15mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 2 U de Taq DNA polimerasa y 10 µM de cada primer en buffer de PCR 10X (Taq DNA polimerasa PCR kit; Qiagen), La reacción de PCR se realizó con el siguiente programa : 1 min a 95°C, seguido de 30

ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y extensión por 30 segundos a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se visualizaron 10 µL de cada producto en geles de 1-2% agarosa. Los primers utilizados fueron:

NKG2E-Fw(5'-AGAATTAACCTTCAAAATGCTTCT-3')

NKG2E-Rev (5'-GATTCTTGAAGATCCACACTGGT-3')

NKG2C-Fw (5'-GAAGAGAG1TrGCTGGCCTGTA-3')

NKG2C-Rev (5'-CACTGGGCTGATTTAAGTCGAT-3')

F-actina-Fw (5'- AACTGGGACGACATGGAGAAAA-3')

F-actina -Rev (5'-TCGGTGAGGATCTTCATGAGGT-3')

PPI4/GdA-Fw (5' -AGAGCTCAGAGCCACCCAC-3'),

PPI4/GdA-Rev (5'GTGGGAGTCTGGTCTTCC-3'),

GAL1 -Fw (5' -CCCACGGCGACGCCAAC-3'),

GAL1-Rev (5' -AGAGGCAGCTGCCTTTATTG-3').

PSG11-FW(5'-TTGCAGGAGGAAGGACAGC-3')

PSG11-Rev(5'-AAAGTTCCTAATCCTGGAGG-3')

2.10 Western Blot

1 X10⁶ células dNK, pNK CD56^{brillante} y pNK CD56^{tenue} fueron lisadas en buffer de extracción (50 mM Tris Hcl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 1% NP-40, conteniendo inhibidor de proteasas (Sigma)) . Las proteínas fueron separadas en geles de 12% poliacrilamida y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Los filtros fueron bloqueados con 1% BSA en PBS y expuestos a un anticuerpo monoclonal anti galectina 1 (NCL GAL1, Novocastra laboratories LTD) seguido de un anticuerpo anti FC de ratón conjugado con HRP. Los blots sobre los filtros de nitrocelulosa de revelaron con ECL (Amersham).

2.11. Medios condicionados por células dNK o pNK.

Para la generación de medios condicionados, células dNK o pNK CD56^{tenue} aisladas por FACS como se describe en 2.1. fueron incubadas a una densidad de 1×10^6 células/mL por 60 o 96 horas a 37°C en presencia de 5% CO₂. Los medios condicionados utilizados en ensayos de ELISA fueron generados utilizando medio AIMV sin suero (GIBCO). Para generar los medios condicionados utilizados en ensayos de inducción de apoptosis de células T se utilizó medio RPMI conteniendo 10 % suero fetal bovino. En ambos casos el medio de cultivo fue suplementado con 12 ng/mL de IL-15 durante la incubación para mantener a las células vivas.

2.12 Ensayos de ELISA

Placas de ELISA Immulon2 (Dynatech Laboratories Inc.) fueron cubiertas con anticuerpos policlonales anti-galectina 1 de tipo IgG purificados (R&D Systems) (10µg/mL en PBS) por 12 horas a 4°C para luego ser lavadas 3 veces con PBS Tween-20 0.05%. Las placas fueron bloqueadas con 1% BSA en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, y lavadas 3 veces con PBS/Tween-20. Distintos wells se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con diluciones seriadas de galectina 1 en PBS o con medios sin suero, condicionados por células dNK o pNK. Los wells fueron lavados 3 veces con PBS Tween-20 e incubados con anticuerpos policlonales anti-galectina 1 de tipo IgG purificados y biotinilados (R&D Systems) (10µg/mL en PBS 0.1%BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente y lavados 6 veces con PBS Tween-20. Las placas se incubaron luego durante 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1:500 de estreptavidina conjugada con HRP (Zymed) en PBS 1% BSA. Las placas se lavaron 6 veces con PBS Tween-20. Se desarrolló una reacción colorimétrica por incubación por aproximadamente 45 minutos con 200 µL por well de OPD (Sigma) (1 tableta en 20 ML de agua). La reacción se detuvo con 50 µL de HCl 3N. Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas.

2.13 Inducción de apoptosis por medios condicionados por células dNK y galectina 1

Linfocitos totales de sangre, o de decidua aislados como se describe en 2.1., células pNK o dNK aisladas como se describe en 2.2, frescos o activados por 5 días en medio RPMI conteniendo 10 % FCS y 12 ng/mL IL-15 o 100 U/mL IL-2 o 2µg/mL PHA y 200 U/mL IL-2, fueron incubados a 37°C con medios condicionados por células dNK frescos o galectina 1 320 µg/mL, salvo donde se indica que se usó otra concentración. Las incubaciones se realizaron en presencia de 1mM DTT con o sin el agregado de lactosa 50 mM. La inducción de apoptosis fue interrumpida a los 30 minutos, salvo donde se indica otro tiempo de incubación, por la adición de lactosa a una concentración final de 100 mM. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y teñidas con anticuerpos anti CD56 o anti CD3 conjugados con APC sobre hielo. Las células fueron lavadas y teñidas con Anexina V y PI (BD Biosciences) por 15 minutos siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomaron las mediciones fluorométricas de 10000 células usando un citómetro de flujo FACScalibur (Immunocytometry Systems: Becton Dickinson). El porcentaje de células apoptóticas sobre controles no tratados se calculó por substracción acumulativa de histogramas de Overton (Overton 1988) con el software Flow Jo (Treestar).

2.14. Ensayos de TUNEL.

Células CD3+ de decidua fueron aisladas a 0°C con micro esferas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos anti CD3 (Miltenyi Biotec) de linfocitos totales de decidua obtenidos como se describe en 2.1. Las células CD3+ de decidua y los linfocitos totales fueron tratados con el kit DeadEnd Fluoromeric TUNEL System de Promega para la marcación del ADN fragmentado de células apoptóticas siguiendo las instrucciones del fabricante. La incorporación de fluoresceína-12-dUTP se midió usando un citómetro de flujo FACScalibur (Immunocytometry Systems: Becton Dickinson).

2.15. Inhibición de citotoxicidad de células pNK por galectina 1.

Células pNK activadas durante 5 días en medio RPMI conteniendo 10 % FCS y 12 ng/mL IL-15 fueron incubadas a 37°C con 320 µg/mL o distintas concentraciones de galectina 1, según se indica en las figuras, en presencia de 1mM DTT. Las incubaciones fueron interrumpidas a los 30 minutos o a distintos tiempos por la adición de lactosa a una concentración final de 100mM. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y usadas en ensayos de liberación de cromio contra células K562.

Capítulo 3: Las células dNK constituyen un subgrupo con potencial inmunosupresor.

3.1 Introducción : Células NK de decidua y células NK periféricas de sangre.

Durante el embarazo, células fetales hemialogenicas invaden la decidua materna manteniéndose a salvo de ataques por parte del sistema inmune materno, planteando una paradoja que la inmunología aún no ha resuelto.(Billingham et al 1953). Varios factores han sido propuestos para explicar la tolerancia materno-fetal. Sin embargo la comprensión de la inmunobiología del embarazo normal y sus implicancias en patologías relacionadas con el embarazo es limitada.

Una característica prominente de la decidua humana, es la abundante cantidad de células natural killer (NK) que constituyen aproximadamente el 70% de los linfocitos residentes (Moffett-King, A. 2002) Contrastando con ello, las células NK en sangre constituyen menos del 15% de los linfocitos circulantes (Cooper et al 2001 a). Consecuentemente, es posible que las células NK de decidua humana (dNK) jueguen un papel en la implantación y en el embarazo, al menos durante la gestación temprana. A pesar de desconocerse la función in-vivo de las células dNK, su proximidad a los trofoblastos fetales que invaden la decidua materna y no expresan los antígenos clásicos de clase I (HLA-A y HLA-B) (Faulk y Temple 1976) , pero expresan selectivamente HLA-C y las moléculas no clásicas HLA-E, -G, y CD1d (King et al 1996 b, King et al 2000a, Boyson et al 2002 a), condujo a que se propusiera que estos antígenos de clase I interactúan con receptores de las células NK (Moffett-King 2002, King et al 2000 b). Sin embargo, no esta claro cuales son los receptores en células dNK que interactúan con las moléculas HLA expresadas por los trofoblastos, y si esa interacción es responsable de inhibir la actividad lítica de las células NK o de inducir la producción de citoquinas que favorezcan el desarrollo normal de la placenta y el mantenimiento del embarazo (Croy et al 2002). Más aún, las interacciones entre los receptores de células NK y sus ligandos fueron

investigados principalmente en células NK periféricas (pNK), pero la relación entre células dNK y pNK no es clara.

Las células pNK comprenden dos subgrupos, el predominante CD56^{tenue} y el mucho más pequeño CD56^{brillante}, constituyendo ~95% y 5% de las células pNK respectivamente (Cooper et al 2001a). Las células pNK CD56^{tenue} expresan altos niveles de CD16 y de receptores NKG2 y KIRs, son granulares y poseen actividad citotóxica. Las células pNK CD56^{brillante} en su mayoría no tienen gránulos, CD16 ni KIRs, pero expresan en mayor nivel otros marcadores (Campbell et al 2001, Lima et al 2001, Carson et al 1997, Jacobs et al 2001) como CD94 (Voss et al 1998) y selectina-L (Frey et al 1998). Las células pNK CD56^{brillante} producen más citoquinas que las pNK CD56^{tenue} lo que sugiere un rol inmunomodulador para las células pNK CD56^{brillante} (Cooper et al 2001 b y c). La similitud de las células dNK y pNK CD56^{brillante}, al menos en su fenotipo CD56^{brillante} CD16⁻ sugiere que las células dNK son derivadas de células pNK CD56^{brillante} que ingresan al útero y se diferencian a células dNK en el micro ambiente de la decidua. Ambos tipos celulares tienen baja actividad citotóxica sobre las células K562, blanco de células NK (Ver capítulo 4), y expresan mensajeros para CD3ε (King et al 1998), a diferencia de las células pNK CD56^{tenue}. Por otro lado al igual que las células pNK CD56^{tenue}, las células dNK son granuladas y expresan KIRs (Verma et al 1997, Hiby et al 1997). Otras características son únicas de las células dNK como la expresión del marcador de activación CD69 (Loke et al 1995).

Salvo alguna comparación adicional mostrando diferencias fenotípicas y funcionales entre células pNK y dNK (Deniz et al 1994) no hay una comparación extensa de las células dNK y ambos tipos CD56^{brillante} y CD56^{tenue} de células pNK. A tal fin se realizó la comparación de los perfiles de transcripción ex-vivo de células pNK CD56^{brillante}, pNK CD56^{tenue} y dNK utilizando microarrays de oligonucleotidos. Los perfiles de transcripción obtenidos proveen información

detallada sobre las diferencias entre células dNK y pNK, como también sobre las diferencias entre células pNK CD56^{tenue} y pNK CD56^{brillante}. Utilizando un enfoque estadístico restrictivo se identificó un gran número (197) de genes diferencialmente expresados entre las células dNK y pNK, mientras que sólo ~40 genes permitieron diferenciar a los 2 subgrupos de células pNK entre sí. Múltiples genes son expresados por células dNK, sin presentar transcritos en las células pNK. Se validó la expresión diferencial en células dNK de un número de genes/proteínas por RT-PCR o citometría de flujo (FACS). Varios de los genes diferencialmente o únicamente expresados por células dNK codifican proteínas con un posible rol en la tolerancia materno-fetal.

3.2 Comparación de los perfiles de expresión de células dNK y pNK humanas por análisis con microarrays.

Las células dNK CD56^{brillante} y las células pNK (CD56 brillante y tenue) fueron distinguidas sólo por unos pocos marcadores de superficie diferencialmente expresados (Moffet-King 2002). Sus diferencias funcionales no están claramente establecidas. Con el objeto de realizar una caracterización más extensa de las células dNK en relación a las células pNK e identificar genes diferencialmente expresados por las células dNK que provean indicios de su función se compararon los perfiles de expresión de células dNK y pNK frescas cuyos ARN fueron obtenidos inmediatamente después de aislar las células. Las células obtenidas como se describe en materiales y métodos fueron aisladas por FACS sorting como se muestra en la figura 3.1 En total se procesaron 19 muestras: 5 de cada tipo de células pNK y 9 de células dNK.

Las 19 muestras fueron organizadas de acuerdo a la similitud de sus patrones de transcripción, aplicando un algoritmo de agrupamiento jerárquico no supervisado (Eisen et al 1998) considerando los genes de expresión variable. En la figura 3.2. se presenta el dendograma resultante en el que el largo de las líneas refleja las diferencias comparativas en los perfiles de expresión de cada muestra de

células dNK y pNK. A nivel de transcripción las células dNK son claramente distintas de ambos tipos de células pNK y dentro del grupo de las células pNK un punto de bifurcación secundario separa a las CD56^{brillante} de las CD56^{tenue}. En otras palabras los dos subgrupos de células pNK están mucho más cercanamente relacionados entre sí de lo que cualquiera de ellos lo está de las células dNK.

La comparación de los tres tipos celulares de a pares por el test T de Student reveló 1758 genes con expresión diferencial ($p \leq 0.01$) al menos en una de las tres comparaciones (pNK CD56^{brillante} vs. pNK CD56^{tenue}, pNK CD56^{brillante} vs. dNK y pNK CD56^{tenue} vs. dNK). La mayoría de estos genes corresponden a comparaciones que involucran a las células dNK. Aún después de corregir por la diferencia de tamaño de las muestras, el número de genes diferencialmente expresados entre las células pNK resulto ser 3 veces menor al de los genes diferencialmente expresados entre las células dNK y las pNK (tabla 3.1.).

Para reducir el número de genes diferencialmente expresados a un número manejable, se consideraron genes con un cambio en el nivel de expresión de 3 o más veces y con una significatividad estadística altamente conservadora ($p \leq 0.001$) en al menos una de las tres comparaciones de a pares. Doscientos setenta y ocho genes se ajustaron a estos criterios. La figura 3.3. representa a estos genes agrupados por similitud en sus perfiles de expresión a través de las distintas muestras.

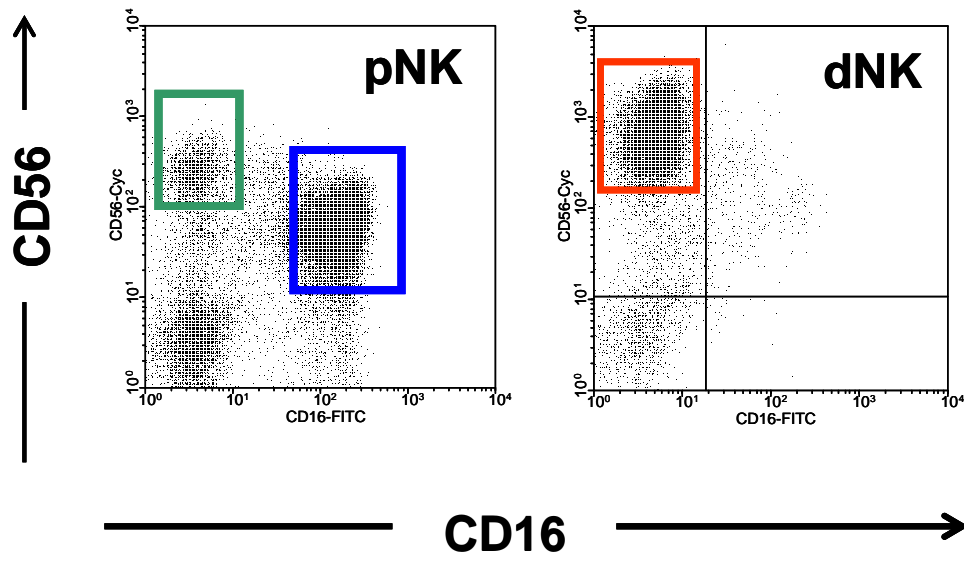


Figura. 3.1. Esquema utilizado para el aislamiento de células NK por citometría de flujo. dNK (rojo), pNK CD56^{brillante} CD16⁻ (verde), y pNK CD56^{tenué} CD16⁺ (azul). Suspensiones de linfocitos periféricos y de decidua fueron teñidas con anticuerpos monoclonales reactivos contra CD3, CD16 y CD56. Los linfocitos fueron primero seleccionados por sus parámetros de FS y SS, y luego se aplicó un filtro para células CD3⁻. Las células fueron entonces aisladas sobre la base de los niveles de expresión de CD56 y CD16.

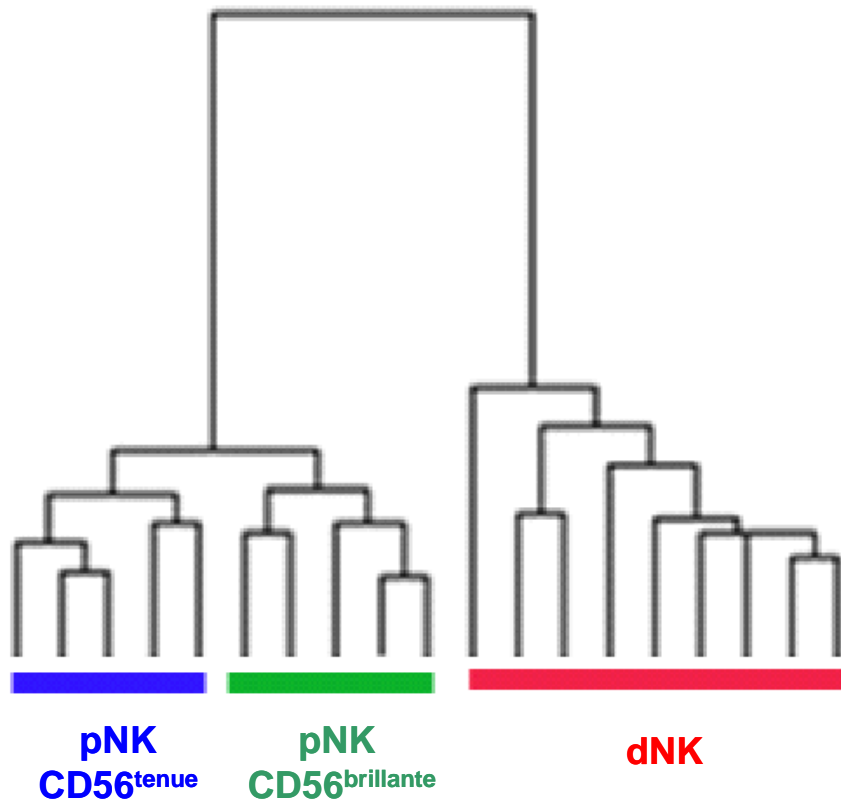


Figura 3.2 dNK, pNK CD56^{brillante} y pNK CD56^{tenue} representan 3 subgrupos distintos de células NK. Agrupamiento jerárquico no supervisado de muestras de células NK basado en los perfiles de expresión de genes con niveles de expresión variable. La organización y largo de las distintas ramas del dendrograma reflejan la similitud en los perfiles de expresión de las distintas muestras. No se observó correlación entre la edad gestacional (6-12 semanas) y el agrupamiento resultante de las muestras.

Tabla 3.1. Número de genes diferencialmente expresados en las comparaciones de a pares entre los distintos subtipos de células NK

Número de muestras consideradas			Número de genes diferencialmente expresados por comparación		
dNK	pNK ^{brillante}	pNK ^{tenue}	dNK vs. pNK ^{brillante}	dNK vs. pNK ^{tenue}	pNK ^{brillante} vs. pNK ^{tenue}
9*	5	5	1181	1164	287
5*	5	5	813	771	287
9**	5	5	1332	1387	352
5**	5	5	1034	1031	352

Las comparaciones se realizaron utilizando el test T de student paramétrico* o el test no paramétrico** de sumas ranqueadas de Wilcoxon con un P = 0.01 (sin ajustar por múltiples testeos). La primer fila corresponde al test T de student con varianzas desiguales. En la segunda fila el mismo test se realizó con todas las combinaciones posibles de 5 muestras de las 9 muestras originales de células dNK, promediándose el número de genes diferencialmente expresados. Esto elimina los desvíos generados por la diferencia en el tamaño de las muestras. En la tercer fila se utilizó el test no paramétrico de sumas ranqueadas de Wilcoxon, considerando la diferencia en el tamaño de las muestras, y en la fila 4 se consideraron todas las combinaciones posibles de 5 muestras de las 9 muestras de células dNK.

Aproximadamente el 70 % de los 278 genes diferencialmente expresados son sobre-expresados en células dNK (197 genes) en las comparaciones con células pNK CD56^{brillante} o CD56^{tenue} (Figura 3.3), mientras que solo 30% de los genes fueron sobre-expresados por las células pNK contra las células dNK como se ilustra en el diagrama de Venn (Figura 3.4).

A modo de control se verificó que CD56, un marcador prototípico de células NK estuviera incluido en los 278 genes diferencialmente expresados. CD56 (NCAM-1) reveló mayores niveles de expresión en las células dNK que en cualquiera de los 2 tipos pNK. Esto también fue verificado por FACS (Figuras 3.1 y 3.6 A). CD16 permite identificar a las células pNK CD56^{tenue} ya que no es expresado por las células dNK ni pNK CD56^{brillante} (Figura 3.6. B). Este resultado era previsible dado que la expresión de CD16 fue uno de los parámetros utilizados para aislar las células (Figura 3.1.)

Los genes fueron clasificados en categorías funcionales basadas en información disponible en bases de datos de acceso público (ver Materiales y Métodos). Una parte importante de los transcritos enriquecidos en células dNK involucra mensajeros que codifican proteínas de membrana (Figura 3.4. B). En la figura 3.5 se muestra el cambio en el nivel de expresión de cada uno de los 278 genes expresados diferencialmente en las comparaciones de a pares.

La expresión de varios de estos genes fue adicionalmente verificada por citometría de flujo (Figura 3.6) o RT-PCR (Figura 3.7)

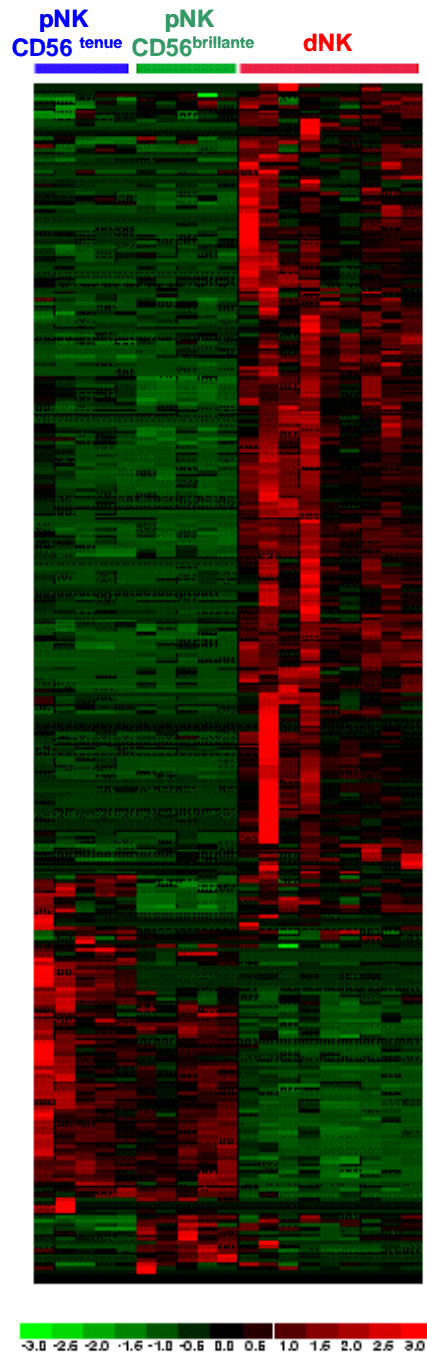
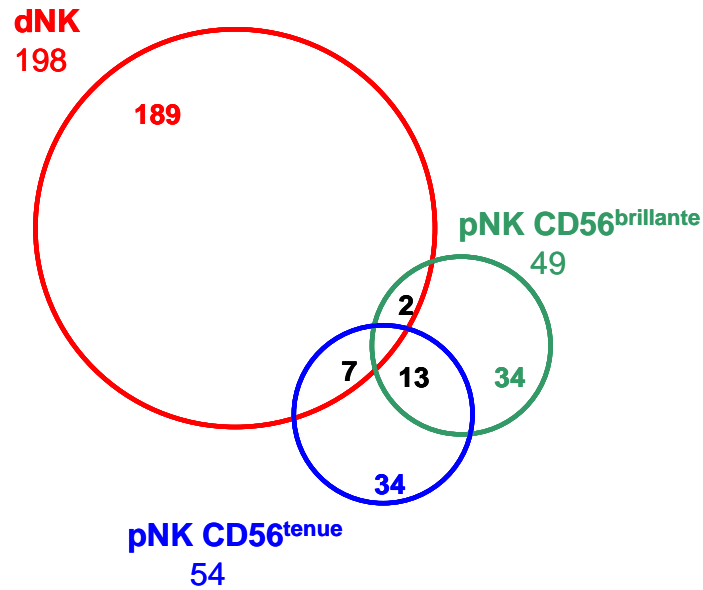


Figura 3.3. Perfiles de intensidad relativa de 278 genes diferencialmente expresados con un cambio de al menos 3 veces y un valor $p \leq 0.001$ en al menos una de las tres comparaciones (dNK vs. pNK CD56^{brillante} ; dNK vs. pNK CD56^{tenue} ; pNK CD56^{brillante} vs. pNK CD56^{tenue}). Cada fila representa las intensidad de hibridización relativa de un gen particular a través de las distintas muestras. Cada columna representa una muestra. Los colores reflejan la magnitud de expresión relativa de un gen a través de las distintas muestras. Rojo brillante representa mayor expresión, verde brillante menor expresión, Negro corresponde a la intensidad promedio de todas las muestras.

A



B

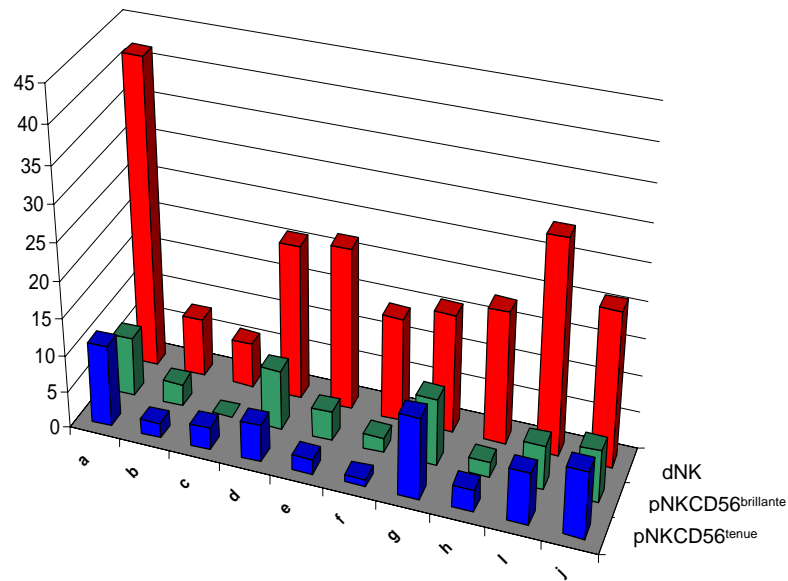


Figura 3.4. La mayor parte de los genes diferencialmente expresados son sobre-expresados en las células dNK. (A) Diagrama de Venn generado por la intersección de los genes diferencialmente sobre-expresados por cada tipo de célula NK. Los genes se consideraron sobre-expresados en un tipo de células NK si fueron diferencialmente expresados por ese tipo de célula NK en relación a al menos uno de los otros dos tipos NK en las comparaciones de a pares por test T de Student con un $p \leq 0.001$ y un cambio en el nivel de expresión de al menos 3 veces. (B) Distribución en categorías funcionales de los genes sobre-expresados por cada tipo de célula NK. a, moléculas de superficie/receptores, adhesión; b, quemoquinas/citoquinas/proteínas inmunomoduladoras y otras proteínas secretadas; c, moléculas efectoras del sistema inmune y moléculas relacionadas a apoptosis; d, genes relacionados a la transducción de señales; e, genes relacionados al citoesqueleto; f, ciclo celular y estrés; g, proteínas de unión a DNA/ transcripción/traducción; h, metabolismo; i, otros genes; j, genes de función desconocida.

3.2.1. Proteínas de membrana sobre-expresadas en células dNK.

3.2.1.1. Tetraspaninas e Integrinas.

Un gran número de los 278 genes diferencialmente expresados codifican para moléculas de superficie y receptores (Figuras 3.4. B y 3.5 A). Entre ellas, tres miembros de la superfamilia de proteínas con 4 regiones transmembrana, también conocida como tetraspaninas, (CD151, CD9 y tetspan-5) son únicamente expresadas por las células dNK. Las células dNK también sobre-expresan dos subunidades de integrinas α D (ITGAD; CD11 d) y β 5 (ITGB5). Otras tetraspaninas (CD53 y CD63) e integrinas (β 1 [ITGB1} y α x[IGAX; CD11c]) también son sobre-expresadas por células dNK por lo menos en relación a uno de los subtipos de células pNK. Las integrinas están involucradas en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular influenciando diversos procesos como adhesión celular, migración, activación, e interacción con células blanco. Muchas de las tetraspaninas pueden facilitar estos procesos formando redes de tetraspaninas que organizan las moléculas de membranas en clusters (por ejemplo formando con otras integrinas, marcadores celulares o tetraspaninas complejos funcionales a la transducción de señales, Yauch et al 2000, Hemler et al 2001, Zhang et al 2001, Kazarov et al 2002, Vogt et al 2002, Yang et al 2002,). La sobre-expresión de estas moléculas podría estar relacionada a la migración , y retención de células NK en la decidua y/o su función efectora en las mucosa del útero durante el embarazo. Por FACS se confirmó la expresión en superficie de CD9 y CD151. CD9 , sólo fue detectada en células dNK surgiendo como un marcador específico de este tipo de células NK ex-vivo (figuras 3.6 C y D).

Recientemente se identificó un ligando para CD9 de ratón, la glicoproteína específica de embarazo 17 (PSG17, por pregnancy specific glycoprotein 17) (Waterhouse et al 2002). Esto lleva a formular la hipótesis de que las células dNK podrían interactuar con PSGs en la placenta mediante CD9 y ser inducidas a producir citoquinas que permitan el desarrollo del embarazo. Las PSGs

constituyen una familia de proteínas secretadas en la placenta que fueron originalmente aisladas de la sangre de mujeres embarazadas. La concentración sanguínea de PSGs aumenta exponencialmente hasta el término del embarazo (Lin et al 1974) y bajos niveles de PSGs están asociados a abortos espontáneos (Arnold et al 1999). La administración de anticuerpos anti-PSG produjo la inducción de abortos en primates indicando que las PSGs son esenciales para un embarazo exitoso (Bohn y Weimann 1974). Adicionalmente las PSGs tienen la capacidad de inducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias por monocitos (Snyder et al 2001). Interesantemente PSG11 es sobre-expresada diferencialmente por las células dNK. Debido a que el cambio en el nivel de expresión es levemente inferior a 3 veces no se la incluyó en la figura 3.5. La expresión diferencial de PSG11 fue confirmada por RT-PCR (Figura 3.7)

3.2.1.2. Receptores de tipo lectina

NKG2C y NKG2E son sobre-expresados por células dNK lo cual fue confirmado por RT-PCR (Figura 3.5 A y Figura 3.7). Ambos mostraron un aumento en la hibridación de 3 a 5 veces. NKG2C se asocia a CD94 y constituye un receptor activador debido a la falta de ITIMs en su dominio citoplasmático. CD94/NKG2C se asocia a DAP12 y una HLA E (Lanier et al 1998 b, Carretero et al 2000). El ligando de NKG2E se desconoce. También se desconoce la función de NKG2E a pesar de parecerse a NKG2C en la ausencia de ITIMs y la presencia de lisina en la región transmembrana que le permitiría interactuar con DAP12 (Lazetic et al 1996). Más aun la detección de proteína de NKG2E aun no ha sido reportada.

El receptor inhibitorio tipo lectina asociado a CD94/NKG2A, que posee dos ITIMs en su dominio citoplasmático y cuyo ligando es HLA-E, no fue incluido en el microarray. Por FACS se detectó su expresión en la forma asociada a CD94 en los 3 subtipos de células NK utilizando el anticuerpo monoclonal Z199 específico para NKG2A y anti-CD94. El análisis de los datos de los

microarrays mostró que CD94 no es diferencialmente expresado. La forma en se integran en la célula las señales de receptores inhibidores y activadores de tipo lectina aun debe ser explorada.

Ly49 L (Figura 3.5 A, KLRA1) es expresado por todas las muestras dNK pero esta ausente de las muestras pNK. Este transcripto es derivado de un gen que codifica a un miembro de la superfamilia de lectinas relacionado a la familia de genes Ly49 de ratón. En humanos sólo se han detectado transcriptos que conducirían a la producción de proteínas truncadas por la sustitución de un nucleótido que precede al sitio donante de splicing en el exon 5 (Barten, R., y J. Trowsdale. 1999, Westgaard et al 1998). El transcripto completo fue en cambio detectado en baboon y orangután (Mager et al 2001, Guethlein et al 2002). Queda por explorar si el transcripto completo y la proteína codificada pueden ser producidas por células humanas, en particular por células dNK, y en tal caso cual sería su función.

3.2.1.3. KIRs

Todos los KIRs presentes en el microarray (KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DL3, y KIR2DL4) son sobre-expresados por células dNK (Figura 3.5 A) . Se conoce la expresión de KIRs por parte de células dNK y pNK CD56^{tenue} pero no por parte de células CD56^{brillante}. La visualización de la expresión de KIRs por FACS usando los anticuerpos monoclonales CD158a, CD158b, y NKB1 (Figura 3.6, E y F) mostró consistentemente una mayor proporción de células dNK que pNK CD56^{tenue} expresando KIRs en concordancia con un mayor nivel de mensajeros detectados por microarray en las muestras de células dNK. Estos datos están en concordancia con datos publicados anteriormente sobre la expresión de KIRs en células de sangre periférica y decidua obtenidas de un mismo individuo (Verma et al 1997).

La expresión de KIR2DL4 ha sido reportada tanto en células dNK como pNK (Rajagopalan y Long 1999, Ponte et al 1999) Aunque se lo ha sugerido como un receptor de HLA-G datos recientes no apoyan esta conclusión (Allan et al 1999, Boyson et al 2002 b). De acuerdo a los microarrays KIR2DL4 sería expresado en mayor nivel en células dNK que en células pNK CD56^{tenue} o CD56^{brillante} (Figura 3.5 A). Utilizando anticuerpos monoclonales específicos para KIR2DL4 (Rajagopalan et al 2001) se detectó la expresión del receptor en la superficie de células NK de 5 de 11 muestras de células dNK y en ninguna de 5 muestras de células pNK (Figura 3.6 G). En contraste con otros KIRS cuya presencia varía en genomas individuales, KIR2DL4 esta presente en todos los haplotipos. Se ha descrito la deleción de una base en el gen de KIR2DL4 que predice la generación de una molécula con una cola citoplasmática acortada (Witt et al 2000) que podría resultar en una proteína que no sea expresada en la superficie celular. Un número considerable de individuos son homocigotas para esta deleción (Witt et al 2002), lo que podría explicar en parte la falta de reactividad de varias de las muestras con el anticuerpo monoclonal empleado.

3.2.2. Moléculas con potencial inmunosupresor

3.2.2.1. Galectina 1 y Core 2 β -1,6- N-acetylglucosaminyl Transferasa (C2GNT).

Galectina 1 presenta un mayor nivel de transcritos en células dNK (Figura 3.5.B), un resultado que fue confirmado por RT-PCR (Figura 3.7). Galectina 1 es miembro de una pequeña familia de proteínas compuesta por 15 proteínas que unen carbohidratos (Ibarregui et al 2005). Las galectinas reconocen N-acetil-lactosamina (galactosil-N-acetilglucosamina) pero poseen mayor afinidad por polilactosaminas presentes en glicoproteínas N- glicosiladas u O-glicosiladas. Dos enzimas son esenciales para la presencia de estas estructuras en N- u O-glicanos. MGAT5 inicia una cuarta ramificación en N-glicanos para formar glicanos tetraantenarios, dicha ramificación es luego alongada con polilactosaminas.

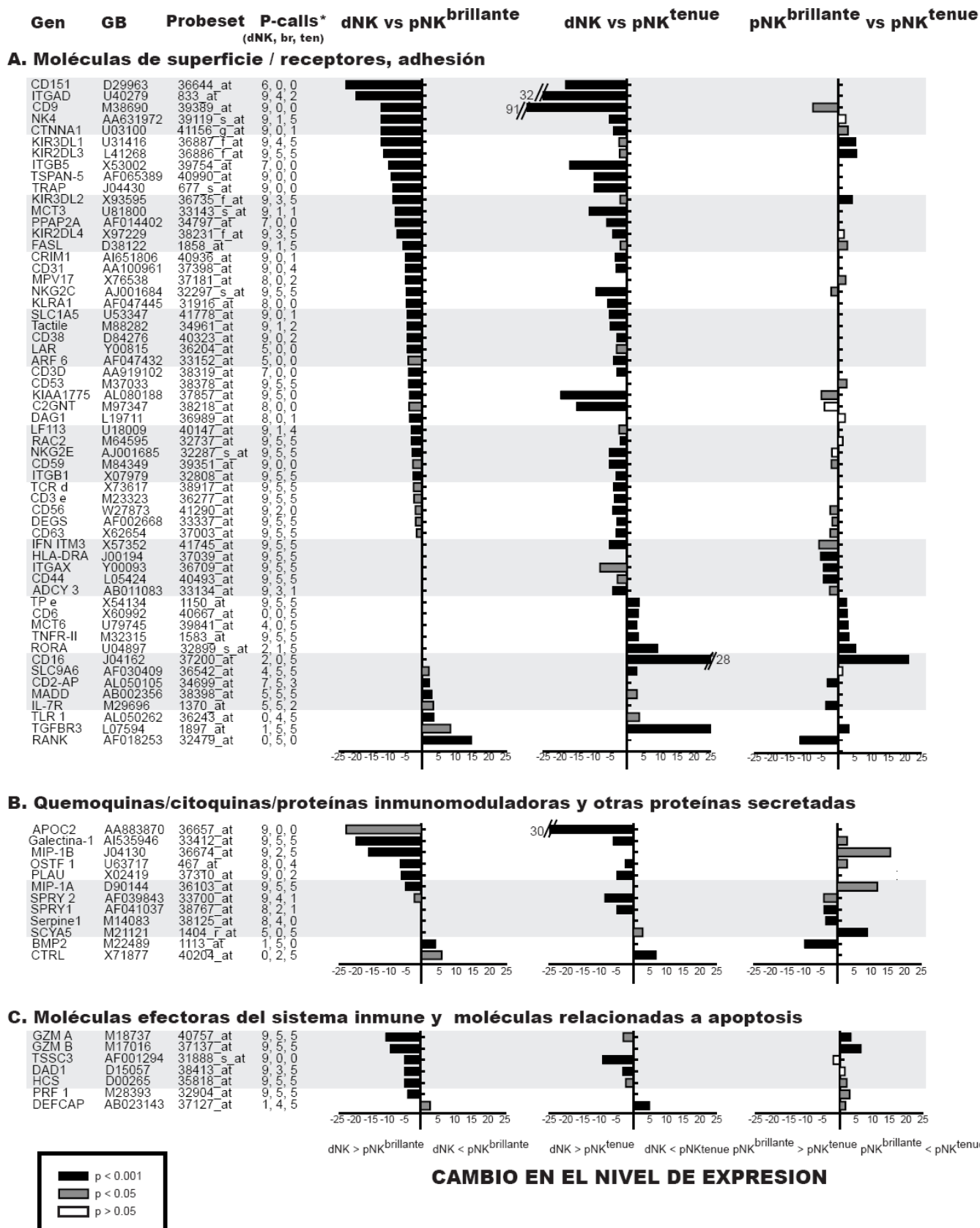
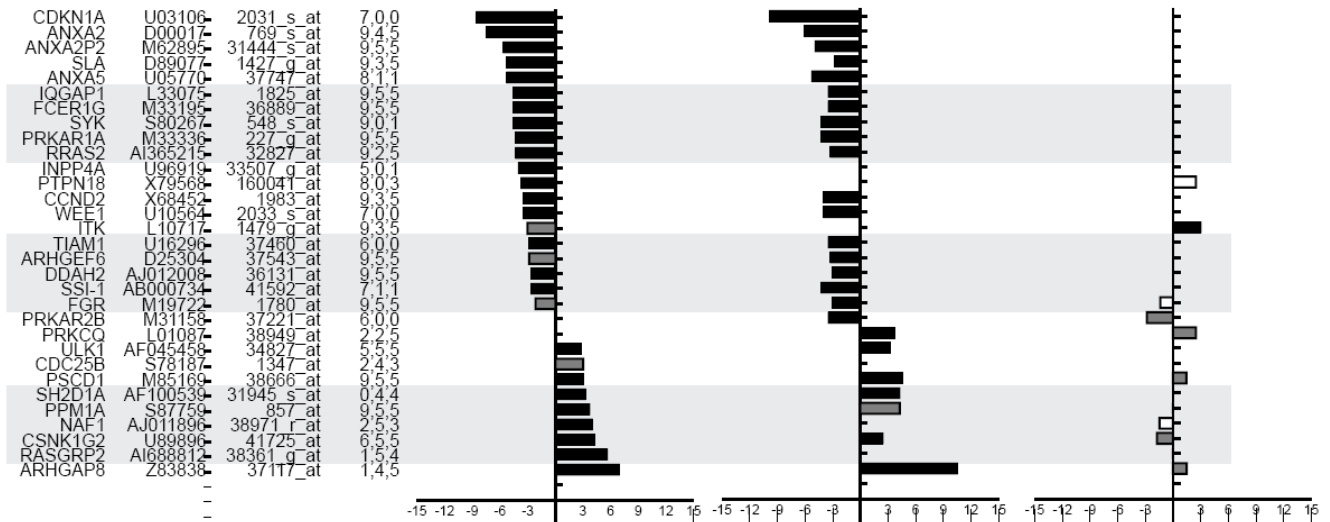


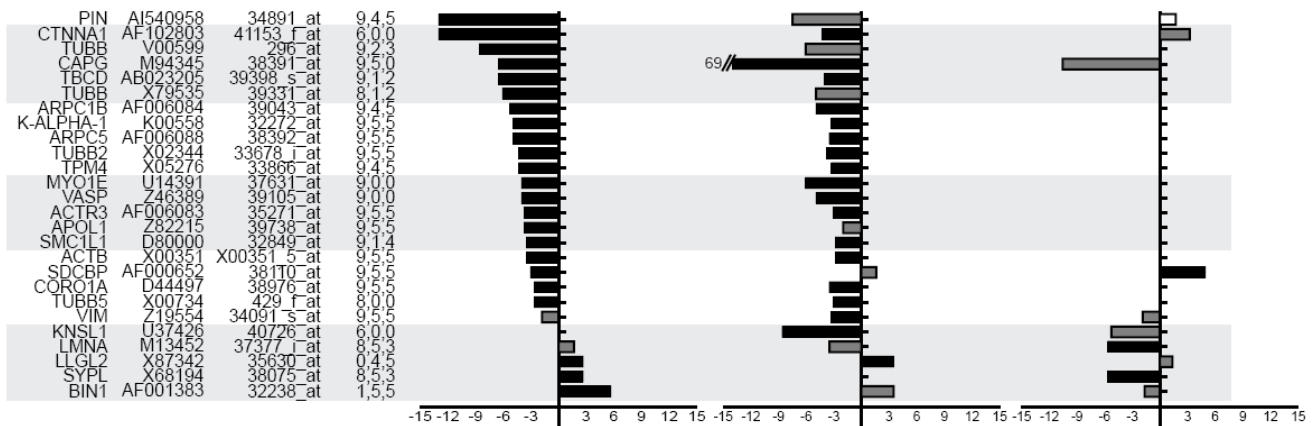
Figura 3.5 . Genes diferencialmente expresados en células dNK y pNK. Cambio en el nivel de expresión de genes con un cambio mayor o igual a tres veces y $p \leq 0.001$ (barras negras) en al menos una de las comparaciones de pares: dNK versus pNK^{brillante} (diagramas izquierdos); dNK versus pNK^{tenue} (diagramas centrales); y

Gen GB Probeset P-calls* dNK vs pNK^{brillante} dNK vs pNK^{tenue} pNK^{brillante} vs pNK^{tenue}
(dNK, br, ten)

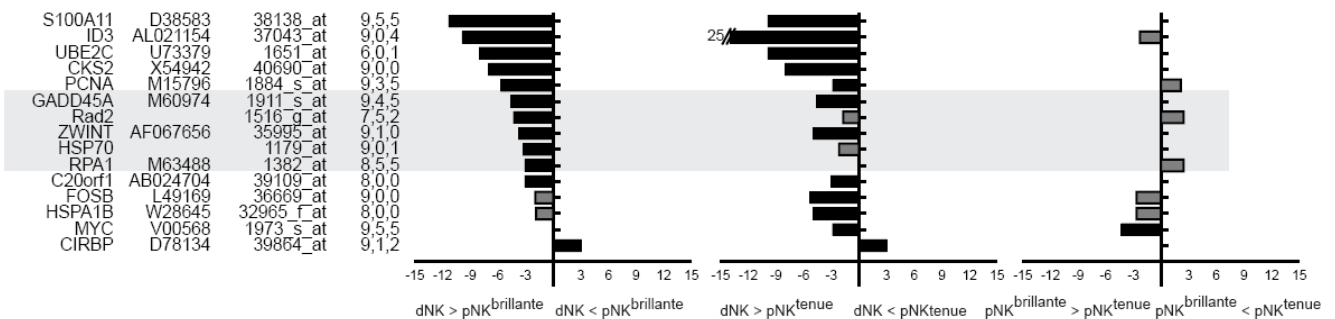
D. Genes relacionados a la transducción de señales



E. Genes relacionados al citoesqueleto

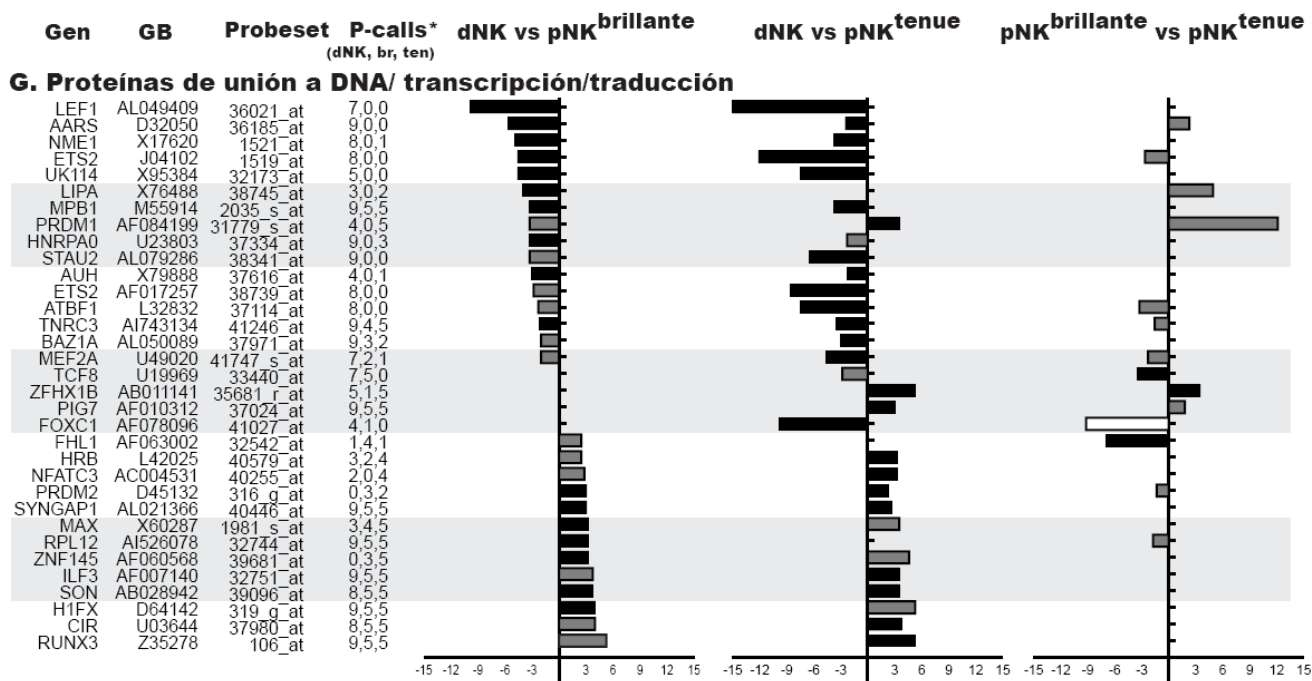


F. Ciclo celular y stress

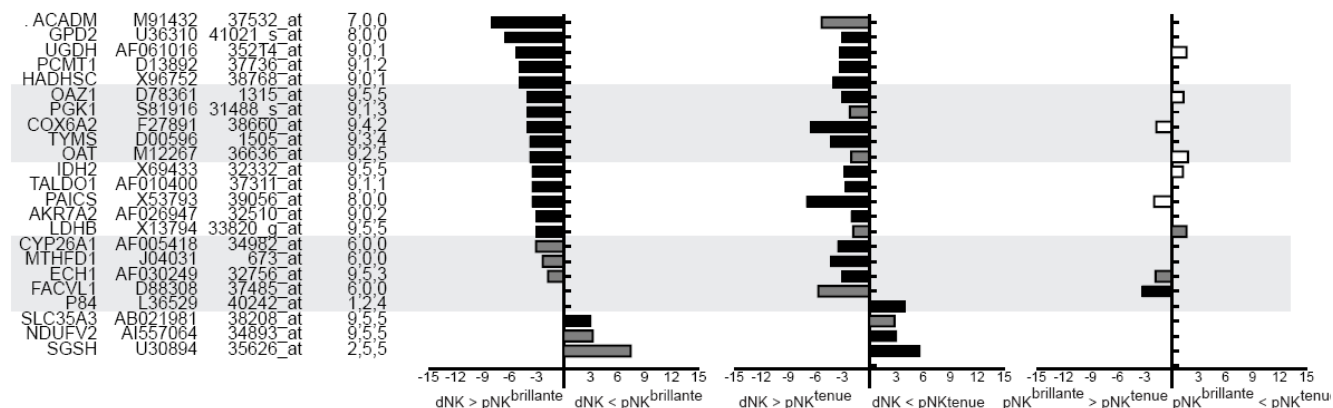


CAMBIO EN EL NIVEL DE EXPRESION

pNK^{brillante} versus pNK^{tenue} (diagrama derecho). Los 278 genes que cumplieron con este criterio fueron clasificados en las siguientes 10 categorías: A, moléculas de superficie/receptores, adhesión. (58 genes); B, quemoquinas/citoquinas/proteínas inmunomoduladoras y otras proteínas secretadas (12 genes); C, moléculas efectoras del sistema inmune y moléculas relacionadas a apoptosis (7 genes); D, genes relacionados

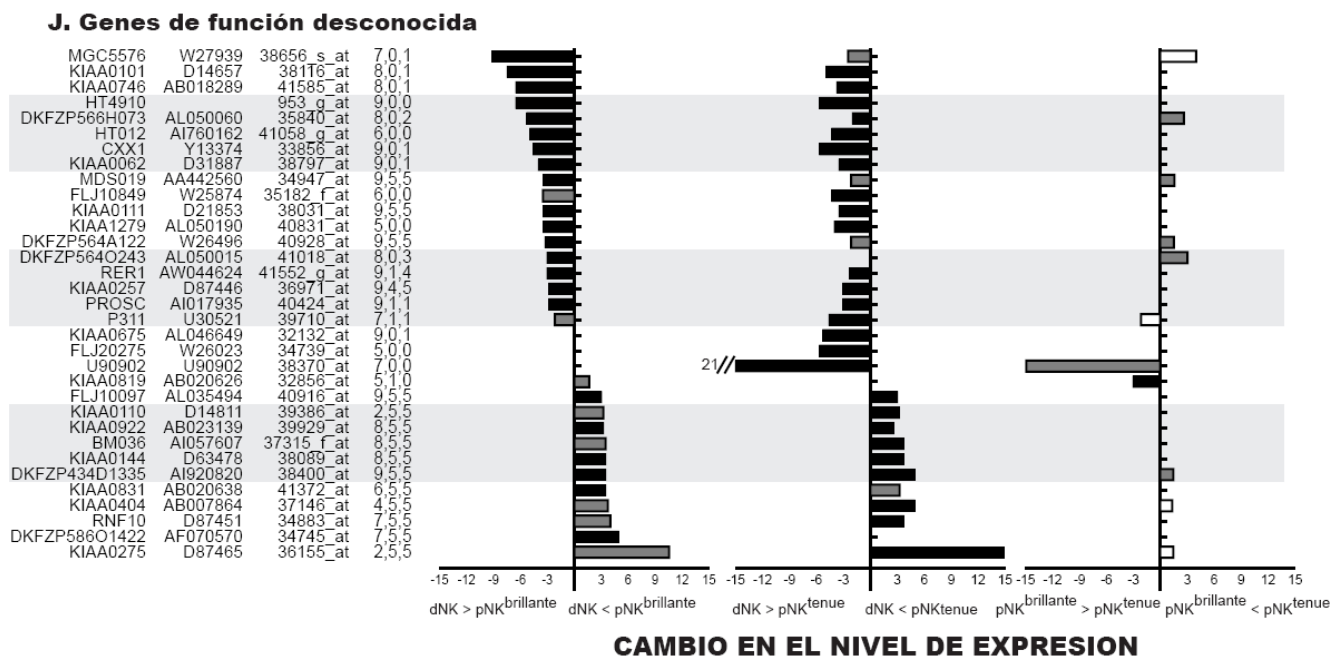
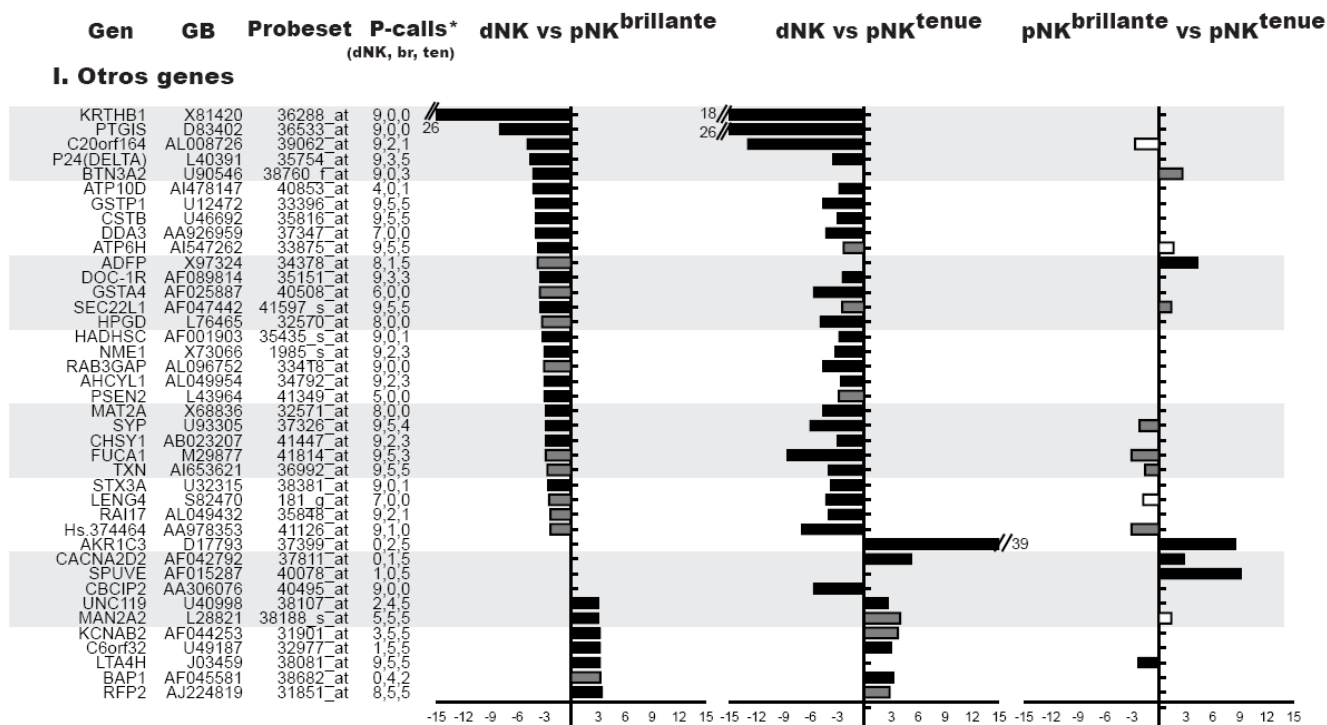


H. Metabolismo



CAMBIO EN EL NIVEL DE EXPRESION

a la transducción de señales (32 genes); E, genes relacionados al citoesqueleto (26 genes); F, ciclo celular y estrés (15 genes); G, proteínas de unión a DNA/ transcripción/traducción (33 genes); H, metabolismo(23 genes) ; I, otros genes (40 genes); J, genes de función desconocida (33 genes). Las barras negras y grises representan niveles en el cambio de transcripción con niveles de significatividad estadística signadas por un valor $p \leq 0.001$ o $p \leq 0.05$ respectivamente. Las barras blancas representan cambios no significativos desde el punto de vista estadístico. Genes, nombres del gen o los símbolos de genes fueron obtenidos de Locuslink o Netaffx (Affymetrix, Inc.). GB, número de acceso de GenBank . Probeset, designación dada por Affymetrix al



set de sondas . P-(Presence calls)(dNK, brillante, y tenue), número de muestras en las que un gen se considera expresado o presente de acuerdo a algoritmos de Affymetrix en 9 muestras dNK, 5 pNK CD56^{brillante}, y 5 pNK CD56^{tenue} respectivamente.

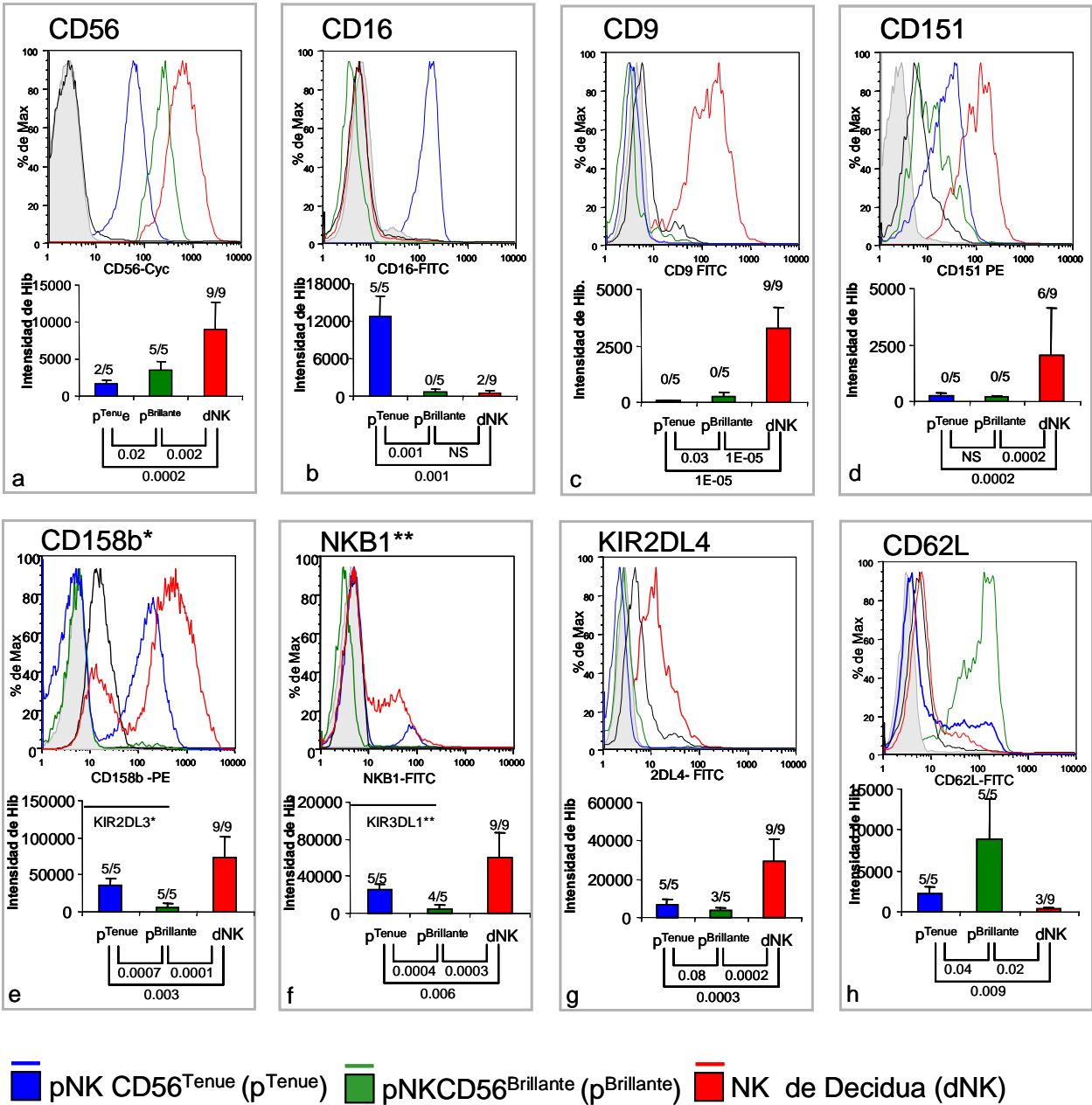


Figura 3.6 Verificación de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo. Para comparar los niveles de expresión de distintas moléculas de superficie se realizaron tinciones triples o cuádruples (CD56 + CD16 + CD3 + molécula de interés.) sobre preparaciones enriquecidas de células pNK o linfocitos de decidua. En cada recuadro se muestra la expresión de los marcadores presentados junto a los valores (barras) de hibridación en los microarrays de los sets de sondas correspondientes al gen respectivo. Se muestran resultados representativos de 5 experimentos independientes. Los histogramas negro y gris corresponden a los controles isotópicos para células pNK y dNK respectivamente, Las líneas y barras tienen códigos de colores para dNK (rojo) pNK CD56^{brillante} (verde) pNK CD56^{tenue} (azul). Los números sobre las barras representan el número de muestras expresando el gen en cuestión (de acuerdo a los algoritmos de Affymetnx) sobre el total de muestras del subtipo de NK correspondiente. Los valores bajo los gráficos de barras representan el valor p obtenido de las comparaciones de a pares por test t de Student para el gen correspondiente. a) CD56, b)CD16, c)CD9, d) CD151, e) KIR2DL3, f)KIR3DL1, g) KIR2DL4, h) CD62L

Por otra parte C2GNT inicia una segunda ramificación (core 2) sobre O-glicanos que es luego alongada con polilactosaminas (Lowe 2001, Daniels et al 2002). Homodímeros divalentes de galectina median interacciones intercelulares o generan estructuras que afectan el agrupamiento o segregación de las glicoproteínas de superficie a las que se unen (Daniels et al 2002). Los perfiles de expresión muestran la ausencia de mensajeros de MGAT5 en los tres subtipos de células NK. Contrariamente C2GNT, requerida para la síntesis de core 2 O-glicanos, sólo se expresa en células dNK y no en células pNK (Figura 3.5.A).

Galectina 1 ha sido implicada en procesos de inmunomaduración e inmunomodulación a través de diversos mecanismos (Rabinovich et al 2002a). Durante la maduración intratímica las células T $CD4^+ CD8^+$ expresan O-glicanos. Galectina 1 media la unión de timocitos a células de estroma. Galectina 1 también induce apoptosis de timocitos inmaduros $CD8^{tenue}$ y $CD4^{tenue}$, y de células T periféricas activadas mediante la segregación de CD45 de CD7 y CD43 O-glicosilados. Este proceso es dependiente de la expresión de C2GNT (Nguyen et al 2001, Daniels et al 2002). La expresión de MGAT5 por parte de células T regula en forma negativa su activación. Se ha descrito que la unión de galectina 3 a proteínas N-glicosiladas en la superficie de células T restringe el reclutamiento de receptores T a la sinapsis inmunológica (Demetriou et al 2001). La sobre expresión de galectina 1 por células dNK puede estar vinculada a la generación de un ambiente inmunosupresor en la interfase materno fetal. La expresión de C2GNT por las mismas células podría también estar vinculada a la inhibición de la actividad citotóxica de las células dNK sobre los trofoblastos.

3.2.2.2. PP14 o Glicodelina A (GdA).

PP14 es sólo expresada por las células dNK y no por las células pNK (Figura 3.7). Su nivel de expresión es variable por lo que no alcanzó la significatividad estadística requerida para ser

incluida en la figura 3.5. PP14 es altamente expresada en 7 de las 9 muestras de células dNK pero no se detectaron mensajeros en ninguna de las muestras de células pNK. Su expresión diferencial fue confirmada por RT-PCR. PP14 es una glicoproteína de 28 KD inicialmente aislada de placenta humana y producida en glándulas endometriales y deciduas gestacionales. El mayor nivel de su producción es alcanzado durante las semanas 10 a 14 del embarazo (Julkunen et al 1988).

PP14 inhibe la proliferación de linfocitos T y regula negativamente a las células T mediante su localización en la zona de contacto entre la célula T y las células presentadoras de antígenos elevando el umbral de activación (Rachmilewitz et al 2002). PP14 también inhibe la actividad citotóxica de células NK sobre la línea celular K562, un blanco clásico de células NK. (Logdberg y Wester 2000).

3.2.3. Moléculas efectoras: Granzimas y perforina.

Las células dNK y pNK CD56^{tenue} son prominentemente granulares (Hiby et al 1997) ambas son también llamadas linfocitos granulares grandes, mientras que las células pNK CD56^{brillante} son menos granulares (Jacobs et al 2001). Los niveles de mensajeros de Granzima B y Perforina (componentes de gránulos citotóxicos) son similares en las células dNK y pNK CD56^{tenue}. Mientras que granzima A es sobre-expresada en células dNK (Figura 3.5.C). El potencial citotóxico de las células dNK no debe ser ignorado. La actividad citotóxica de estas células podría activarse en circunstancias especiales como infecciones virales de los trofoblastos o la remodelación de la decidua. Se han producido reportes contradictorios acerca de la actividad citotóxica de estas células. En el siguiente capítulo se presenta un estudio minucioso de la capacidad lítica de células dNK sobre células blanco clásicas de células NK.

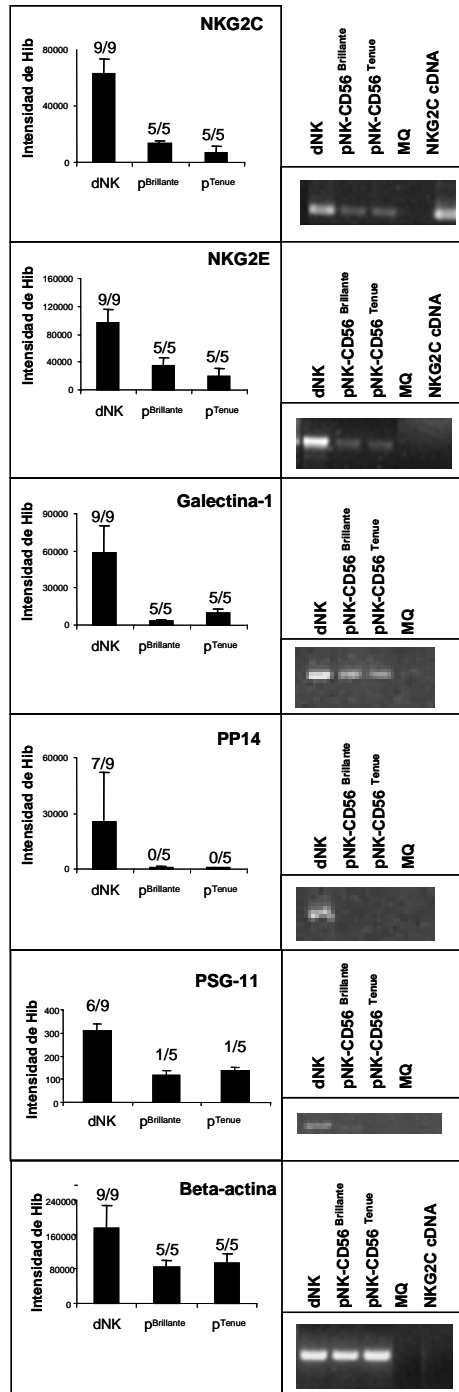


Figura. 3.7. Confirmación de la expresión de mensajeros por RT-PCR. Se realizó RT-PCR sobre RNA total aislado de los distintos subtipos de células NK. Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. A la izquierda se muestran las intensidades de hibridación de cada gen en los microarrays para los tres tipos celulares. Los números sobre las barras representan el número de muestras que expresan el gen en cuestión sobre el total de muestras de cada subtipo de NK., MQ, agua milipore Q.

3.2.4. Otras Moléculas..

Otros genes sobre-expresados por células dNK y que se presentan en la figura 3.5 (por ejemplo CD31, CD38, MIP-1 α/β , Syk, LEF1, AARS, arp2/3 y tubulinas) pueden ser de considerable interés.

Así mismo genes que están ausentes o son expresados con menor intensidad en células dNK pueden ser relevantes para la función de células dNK o pNK. Por ejemplo el receptor de tipo Toll1 (Figura 3.5 A) y SH2D1A (Fig3.5.D) son expresados por ambos tipos de células pNK pero no por células dNK. CD6 es solo expresado por las células dNK CD56^{tenue}, mientras que el receptor activador de NF- κ B, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF presenta mensajeros solo en las células pNK CD56^{brillante}.

Se han sugerido otras funciones para las células dNK aparte de un papel en la tolerancia materno fetal. En particular se han propuesto roles en el desarrollo de la placenta y en la remodelación vascular de las arterias espiraladas en ratones . (Croy et al 202, Gimferrer et al 2002, Anderson et al 1997).

Cabe cuestionar si la sobre-expresión de un gran número de genes por parte de las células dNK no se debe a su activación como consecuencia del procedimiento usado para aislar las células, esto es, disgregación con Colagenasa y DNAsa, incubación para permitir la adhesión de células de estroma y macrófagos a las placas de cultivo, gradientes de densidad para la separación de linfocitos vivos, en total un procedimiento que requiere de 4 a 6 horas. Procedimientos similares han sido utilizados para aislar linfocitos de otros órganos como páncreas, hígado e intestino sin que se describieran efectos activadores. Con el objeto de cerciorarse que no fuera este el caso, células pNK

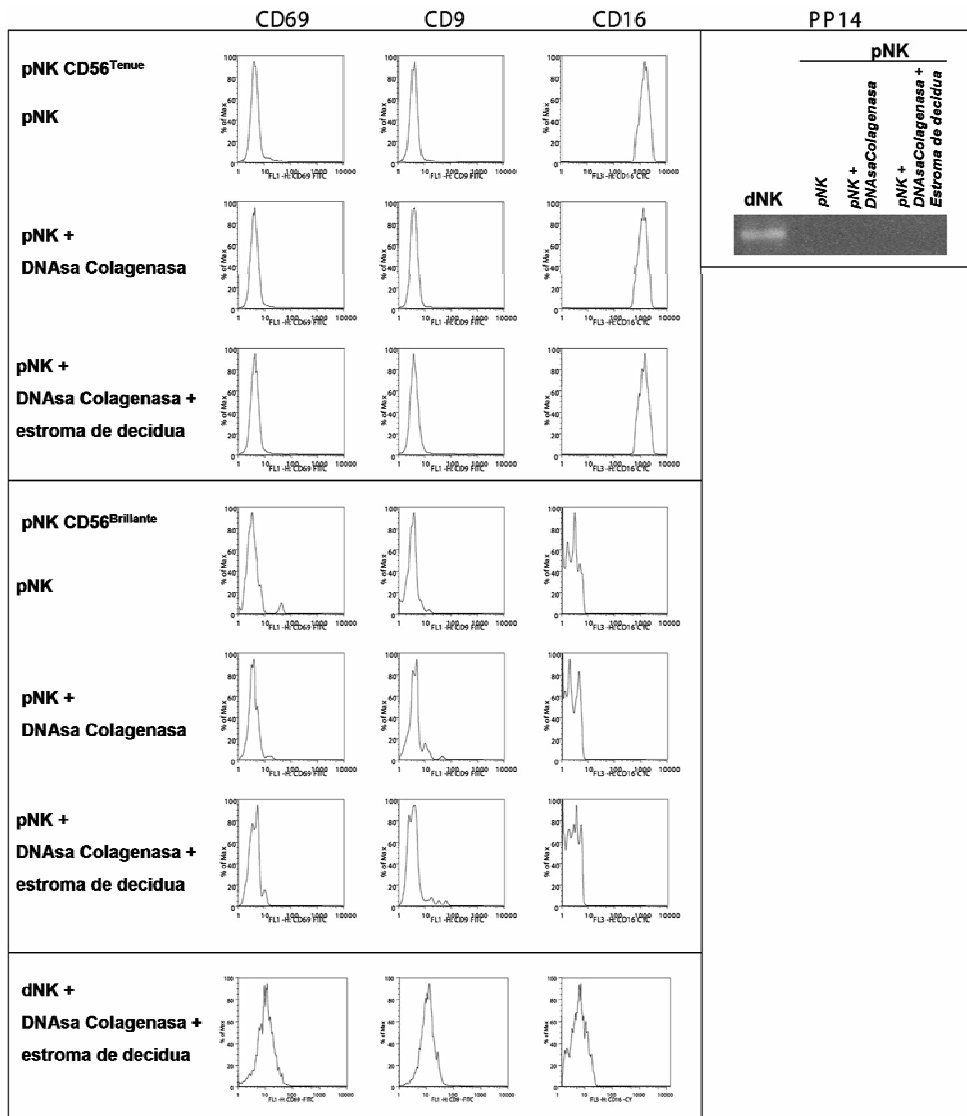


Figura 3.8. La expresión de marcadores de activación y de subtipos específicos de células NK no es afectado por el procesamiento de las muestras con DNAsa y colagenasa seguida por la incubación de las células con o sin células de estroma de decidua. CD69 es un marcador de activación no inducido por el procesamiento en células pNK. CD9 es un marcador característico de células dNK no inducido por el procesamiento en células pNK. CD16 es un marcador de células pNK CD56^{tenué} cuya expresión no es afectada por el procesamiento en células pNK. mRNA de PP14 es detectado sólo en células dNK y su transcripción no es afectada por el procesamiento en células pNK. Las células dNK y células pNK fueron aisladas como se describe en el capítulo 2. Para el procedimiento de aislamiento simulado las células pNK fueron incubadas con 0,1% colagenasa tipo IV y 0.01% DNAsa I en medio RPMI 1640 por 30 minutos a 37°C como se describe para el aislamiento de células dNK en el capítulo 2, seguido de una incubación de 2 horas a 37°C con o sin el agregado de células de estroma. Los linfocitos en suspensión fueron purificados por gradientes de densidad y utilizados en análisis por citometría de flujo. Para el análisis por FACS se establecieron filtros electrónicos basados en los niveles de expresión de CD56 y CD16 de las células como se muestra en la figura 3.1. Para PCR las células pNK fueron sometidas a un paso adicional de purificación usando microesferas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos contra CD56 (Stem Cell Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos experimentos se realizaron 2 veces obteniéndose resultados idénticos.

fueron sujetas a un procedimiento de aislamiento similar seguido del análisis de la expresión de marcadores que permiten distinguir células dNK de células pNK. El procedimiento se realizó con y sin la adición de células de estroma de decidua.

Se analizó por FACS o RT-PCR la expresión de los marcadores más relevantes (Figura 3.5., CD69, un marcador de activación; CD9, un marcador característico de células dNK como se mostró más arriba, CD16, un marcador característico de células pNK CD56^{Tenue}; y PP14, un gen expresado exclusivamente por células dNK). No se observaron cambios en la expresión de estos marcadores en células pNK CD56^{tenue} o CD56^{brillante} independientemente de que el aislamiento se hiciera en presencia o ausencia de células de estroma de decidua (Figura 3.8).

Por lo tanto es poco probable que las diferencias observadas respondan al procedimiento empleado para aislar las células; más bien representan diferencias fisiológicas entre los 3 subtipos de células NK que sugieren un rol para las células dNK en la generación de inmunotolerancia materno-fetal.

Capítulo 4: Las células dNK forman sinapsis activadoras inmaduras y son no citotóxicas

4.1. Introducción: Sinapsis activadoras y sinapsis inhibitoras

De acuerdo al análisis de los perfiles de expresión de células dNK y pNK, y a reportes previos, las células dNK expresan perforina y granzima B a niveles similares que las células pNK CD56^{tenue} y granzima A a niveles superiores que las células pNK CD56^{tenue} (King et al 1993 y capítulo 3), sugiriendo que las células dNK han de tener potencial citotóxico. Distintos reportes han generado interpretaciones encontradas respecto a la actividad citotóxica de las células dNK (Deniz et al 1994, Ponte et al 1999, King et al 2000a, Verma et al 200a).

La actividad citotóxica de las células NK resulta del balance entre señales inhibitoras y señales activadoras originadas de la interacción de receptores en la superficie celular con ligandos expresados en la superficie de la célula blanco (Ljunggren y Karre 1990 , Long 1999, Moretta et al 2000). El balance entre señales activadoras e inhibitoras controla también la organización supramolecular de proteínas en la zona de contacto entre la célula NK y la célula blanco (Davis et al 1999, Vyas 2002, Orange et al 2003), definiendo la formación de sinapsis activadoras o inhibitoras de células NK (NKIS) .

En las NKIS activadoras se acumulan, en una forma temporalmente definida, moléculas de superficie que incluyen receptores activadores y moléculas de adhesión como CD2 y LFA-1, y moléculas intracelulares vinculadas al citoesqueleto, entre ellas actina filamentosa (F-actina), (Vyas et al 2002) seguido por la movilización de gránulos citotóxicos conteniendo perforina y granzimas hacia la zona de contacto entre la célula NK y la célula blanco (Orange et al 2003).

Por otro lado, en las NKIS inhibitoras, se ha descrito la acumulación de receptores KIR del lado de la célula NK, y HLA-C del lado de la célula blanco. Este proceso no requiere de ATP y es insensible a las citocalinas B y D. La acumulación de F-actina no se observa en las NKIS inhibitoras (Davis et al 1999, Mc Cann et al 2003).

En este capítulo se evalúa la actividad citotóxica y la formación de sinapsis inmunológicas por parte de las células dNK con células blanco que no expresan moléculas MHC de clase I y son por tanto normalmente lisadas por células pNK.

4.2. Las células dNK expresan receptores activadores pero su actividad citotóxica esta drásticamente reducida.

Se evaluó cuidadosamente la actividad citotóxica de células dNK frescas inmediatamente después de ser aisladas. Al compararlas con células pNK, las células dNK mostraron una actividad citotóxica severamente reducida sobre las líneas celulares MHC I negativas K562 y 721.221, blancos clásicos de células NK (Figura 4.1). Esto no fue el resultado de una reducción en la viabilidad de las células dNK dado que las mismas recuperaron su actividad citotóxica al ser incubadas en presencia de IL-15 por 12 o 36 horas (Figura 4.1. B). La exposición de células pNK a un protocolo de aislamiento similar al utilizado para aislar células dNK no afectó la capacidad citotóxica de las células pNK sobre ninguna de las dos células blanco, descartando que las diferencias en los protocolos de aislamiento sean la causa de la diferencia en la capacidad citotóxica de ambos tipos de células NK (Figura 4.2.).

La falta de actividad citotóxica de las células dNK es particularmente interesante dado que estas células, comúnmente llamadas linfocitos granulares grandes, contienen gránulos citotóxicos y

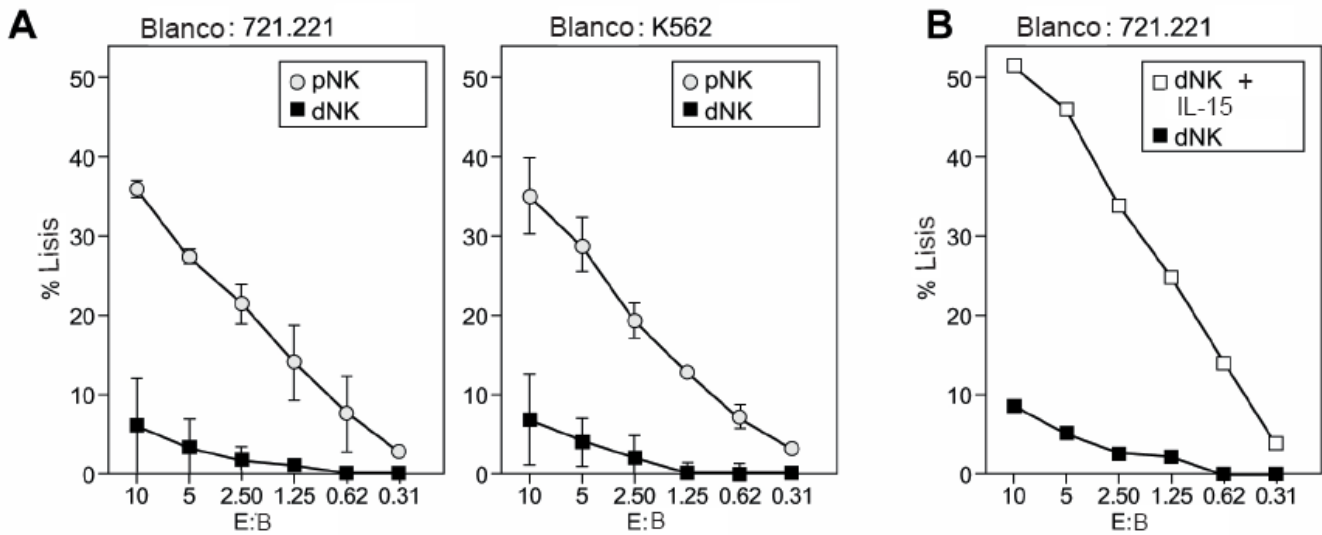


Figura 4.1. Las células dNK tienen reducida actividad citotóxica sobre células blanco clásicas de células NK. A) Ensayos de liberación de cromo evaluando al actividad citotóxica de células dNK (■) y células pNK (○) sobre las líneas celulares , blancos clásicos de células NK, 721.221 (izquierda) y K562 (derecha) (promedio de 4 experimentos independientes). B) Actividad citotóxica de células dNK (■) y células dNK de la misma preparación incubadas por 36 hs con IL-15 (12 ng/mL) en RPMI 10% FCS (□) sobre células blanco 721.221 (un experimento representativo de 3) (E:B tasa de células efectoras a células blanco).

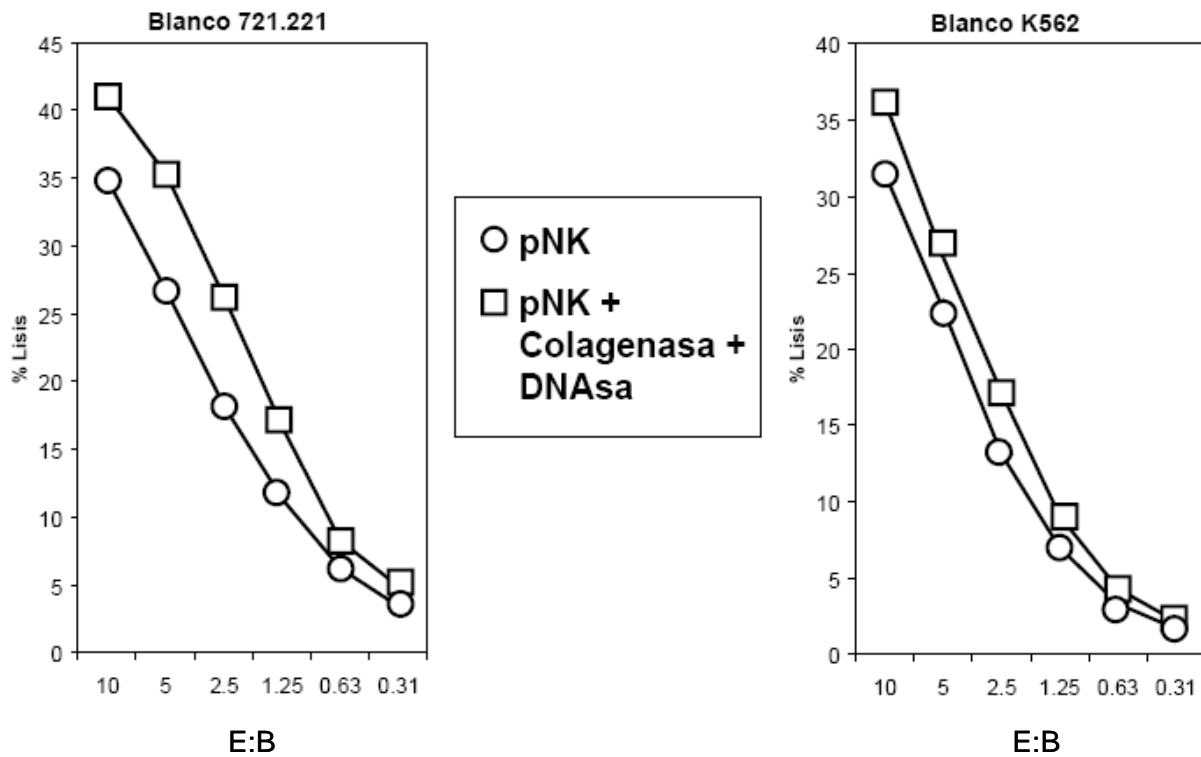


Figura 4.2. El procedimiento utilizado para el aislamiento de células dNK no afecta la citotoxicidad de células pNK citotóxicas. Ensayos de liberación de cromo evaluando al actividad citotóxica de células pNK expuestas(□) o no expuestas (o) a un protocolo de aislamiento similar al utilizado para obtener células dNK empleando colagenasa y DNAsa .Las células blanco empleadas fueron 721.221 (izquierda) y K562 (derecha) (un experimento representativo de 3). (E:B tasa de células efectoras a células blanco).

expresan perforina y granzimas A y B a niveles similares o superiores que las células citotóxicas pNK CD56^{tenue} (King et al 1993, Figura 3.5 capítulo 3). Las células dNK también expresan los receptores activadores de células NK 2B4, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2 y LFA-1 como lo hacen las células pNK (Figura 4.3). La actividad citotóxica de células pNK sobre las células blanco 721.221 es parcialmente mediada por NKG2D dado que puede bloquearse parcialmente con anticuerpos contra NKG2D. Por lo tanto se descarta la falta de receptores activadores como la causa de la baja citotoxicidad de las células dNK.

Las células dNK están cargadas para matar pero algún mecanismo les previene hacerlo.

4.3. Las células dNK forman conjugados con las células blanco pero fallan en la polarización de gránulos citotóxicos hacia el punto de contacto con las células blanco.

Con el objeto de establecer si las células dNK son capaces de iniciar el proceso de citotoxicidad, se analizó su capacidad de formar conjugados con distintas células blanco.

Para poder matar, las células pNK deben primero conjugarse con las células blanco y luego formar una sinapsis inmunológica activadora en el sitio de contacto. Esta estructura involucra la acumulación, por parte de la célula NK, de filamentos de actina junto a otras moléculas asociadas al citoesqueleto y proteínas de superficie, incluyendo CD2 y LFA-1, formando un anillo en el sitio de contacto con la célula blanco denominado cluster supramolecular periférico de activación (pSMAC) (Figura 4.4) (Vyas et al 2002, Orange et al 2003). Subsecuentemente los gránulos citotóxicos son polarizados hacia el sitio de contacto con la célula blanco acumulándose en el centro del anillo (área denominada cSMAC), resultando en una sinapsis inmunológica lítica madura (Orange et al 2003) (Figura 4.4) que libera localmente el contenido de los gránulos citotóxicos matando a la célula blanco en forma direccional.

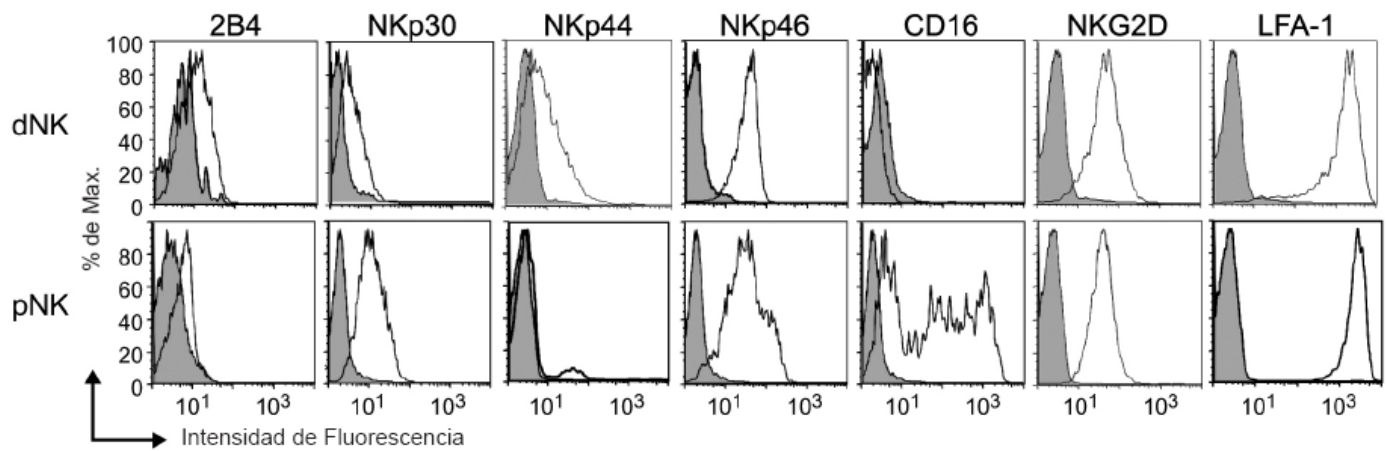


Figura 4.3 Las células dNK expresan receptores activadores. Análisis por FACS de la expresión de receptores activadores por parte de células dNK y pNK. Se realizaron tinciones triples o cuádruples (CD56 + CD16 + CD3 + molécula de interés.) sobre preparaciones enriquecidas de células pNK o linfocitos de decidua. En gris se muestran los controles isotípicos.

Se evaluó por microscopía confocal la capacidad de células dNK de formar conjugados y sinapsis inmunológicas maduras con células blanco. Sesenta a 80 por ciento de las células dNK formaron conjugados con las líneas celulares K562 y 721.221 susceptibles a la actividad citotóxica de células pNK, y con las líneas de trofoblastos BeWo y JEG3 resistentes a la citotoxicidad de células pNK (Figura 4.5 A). Sin embargo las células dNK involucradas en los conjugados fallaron en la polarización de los gránulos conteniendo perforina hacia la célula blanco. La polarización de gránulos conteniendo perforina se visualizó en solo 21.9% de los conjugados entre células dNK y 721.221, mientras que la polarización de gránulos conteniendo perforina se evidenció en 55.4% de los conjugados formados por células pNK y las mismas células blanco (Figura 4.5 B y C). El número de células dNK con gránulos polarizados puede deberse al posicionamiento al azar de los gránulos en el cuadrante celular adyacente a la célula blanco, o puede estar correlacionado con la baja actividad citotóxica observada (Figura 4.1 A).

La proporción de conjugados con gránulos polarizados formados por células dNK y otras células susceptibles (K562) y resistentes (BeWo y JEG3) a la citotoxicidad de células pNK también se vio reducida cuando se los compara con los conjugados formados por células pNK y las mismas células blanco (Figura 4.5.C), independientemente de la expresión de HLA-G por parte de la célula blanco. La reducción en la cantidad de conjugados con gránulos polarizados fue similar con células 721.221 y las mismas células 721.221 transfectadas con HLA-G. Por lo tanto, la expresión de HLA-G no afecta significativamente el grado de polarización de gránulos en células dNK y pNK.

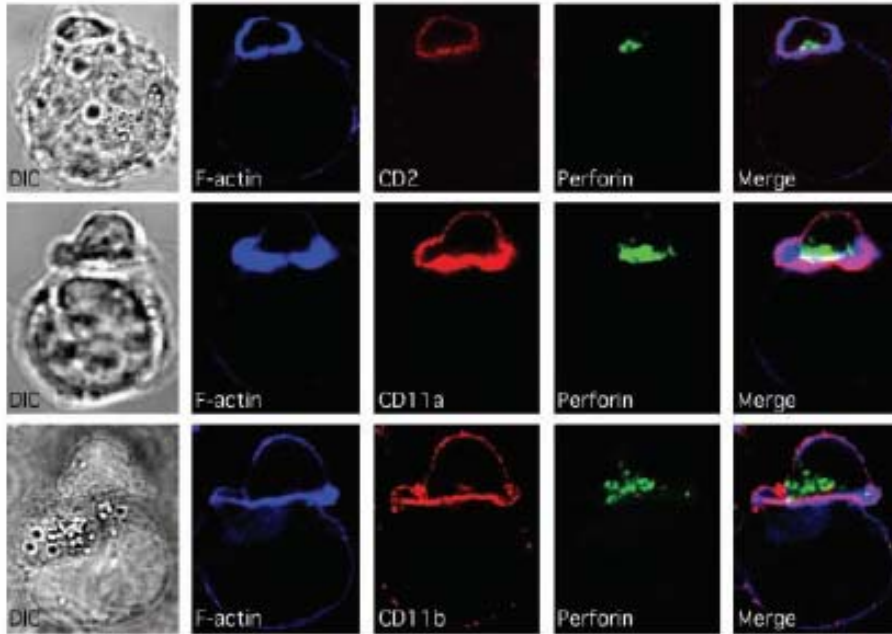
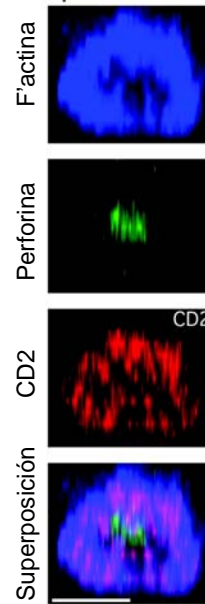
A**B**

Figura 4.4. F-actina, CD2, CD11a, CD11b, y perforina, son polarizadas a la NIKIS madura en las células pNK. A) Se muestran células pNK ex-vivo (células pequeñas) formando conjugados con células K562 (células grandes). En la columna izquierda se muestran imágenes de interferencia de contraste diferencial (DIC) y en las columnas de la derecha imágenes de fluorescencia. En la segunda columna se muestra F-actina (azul). En la tercer columna CD2, CD11a, o CD11b (rojo), en la cuarta columna, perforina (verde). En la quinta columna se muestra la superposición de los canales de fluorescencia. B) Acumulación de F-actina junto con CD2 en el pSMAC, y perforina en el cSMAC de una NKIS lítica madura entre una célula pNK y una célula K562 (Adaptado de Orange et al 2003)

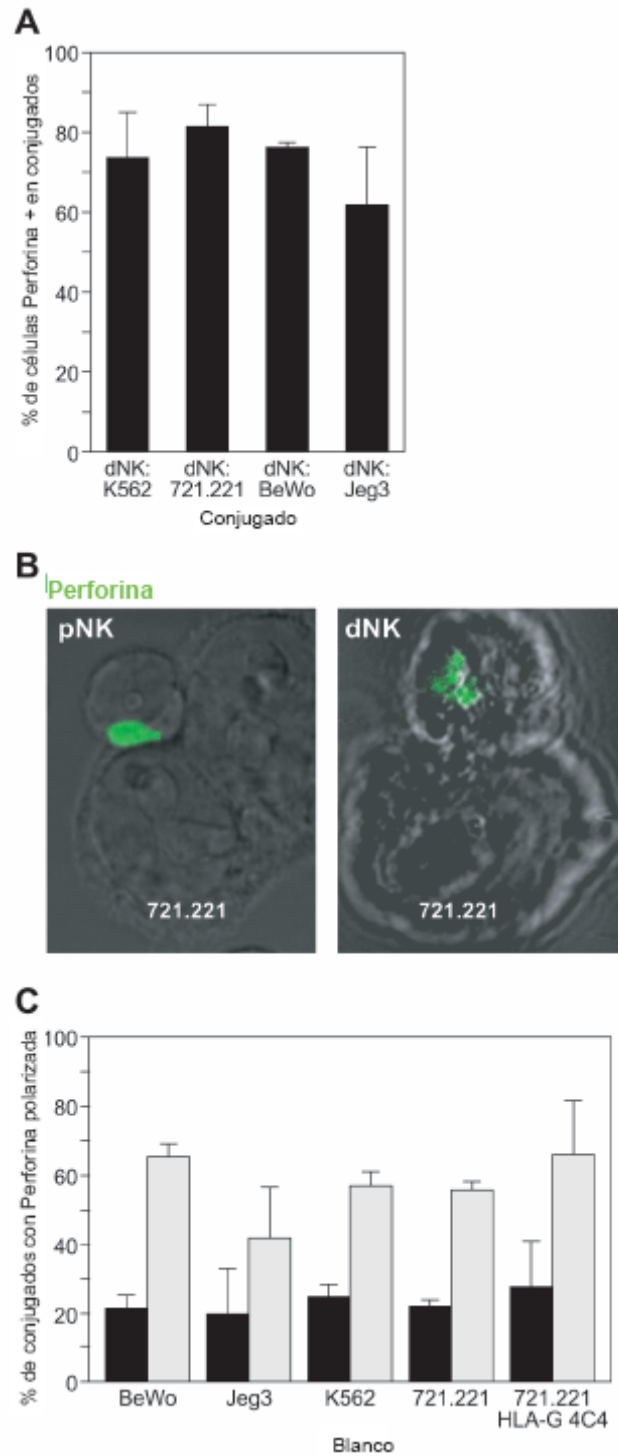


Figura 4.5. Las células dNK forman conjugados con células blanco pero fallan en la polarización de gránulos conteniendo perforina. A) Formación de conjugados por células dNK visualizados bajo el microscopio. Las células dNK fueron identificadas como células perforina positivas. Las barras representan el porcentaje de células perforina positivas ($N \geq 70$ por slide) formando conjugados con células blanco K562, 721.221, BeWo, o JEG3 (promedio de 3 experimentos independientes). B) Imágenes obtenidas por microscopía confocal mostrando un conjugado típico de células pNK y 721.221 con los gránulos conteniendo perforina polarizados (izquierda) y un conjugado típico de células dNK y 721.221 en el que los gránulos conteniendo perforina no son polarizados (derecha). Los gránulos conteniendo perforina se visualizan en verde. C) Polarización de gránulos conteniendo perforina en células dNK (barras negras) o células pNK (barras grises) conjugadas con distintas células blanco de acuerdo a como fueron visualizados por microscopía confocal. Se muestra el porcentaje de conjugados con gránulos conteniendo perforina polarizados hacia la célula blanco

4.4. Las células dNK forman sinapsis inmunológicas inmaduras.

En una sinapsis inmunológica madura formada por una célula pNK, la acumulación de moléculas de superficie y actina filamentosa (F-actina) en la NKIS es seguida por la polarización de gránulos conteniendo perforina. La polarización de actina es necesaria para la acumulación de receptores de superficie y la polarización de gránulos conteniendo perforina, dado que todo el proceso puede bloquearse mediante la pre-incubación de las células pNK con citocalasina D (Orange et al 2003). Con el objeto de evaluar si las células dNK son capaces de iniciar la formación de NKIS activadoras en los conjugados formados con células blanco susceptibles a lisis por parte de las células pNK, se examinó la acumulación de las moléculas de superficie de las células NK CD2 y LFA-1, y F-actina en la interfase entre células dNK y 721.221. CD2 se acumuló en la interfase de 85% de los conjugados formados por células dNK y células 721.221, en la mayoría de los cuales los gránulos de perforina no fueron polarizados (Figura 4.6. A). LFA-1 se acumuló en 90% de los conjugados y F-actina en 91% de los conjugados entre células dNK y 721.221 (Figura 4.6 A y C). Debido a que las células 721.221 tienen un alto contenido de F-actina, se estudió también la acumulación de F-actina en la NKIS de conjugados entre dNK y células K562, las cuales tienen un bajo contenido de F-actina, permitiendo la visualización de la acumulación de F-actina de la célula dNK. Se observó la acumulación de F-actina en 85% de los conjugados entre células dNK y K562, en las que pudo también visualizarse la formación de un anillo periférico de F-actina (pSMAC) (Figura 4.6. D y E).

Por lo tanto las células dNK son capaces de desarrollar los primeros pasos de la formación de NKIS activadoras, esto es la polarización de receptores de superficie y F-actina, pero no pueden formar sinapsis maduras en las que también sean polarizados gránulos conteniendo perforina.

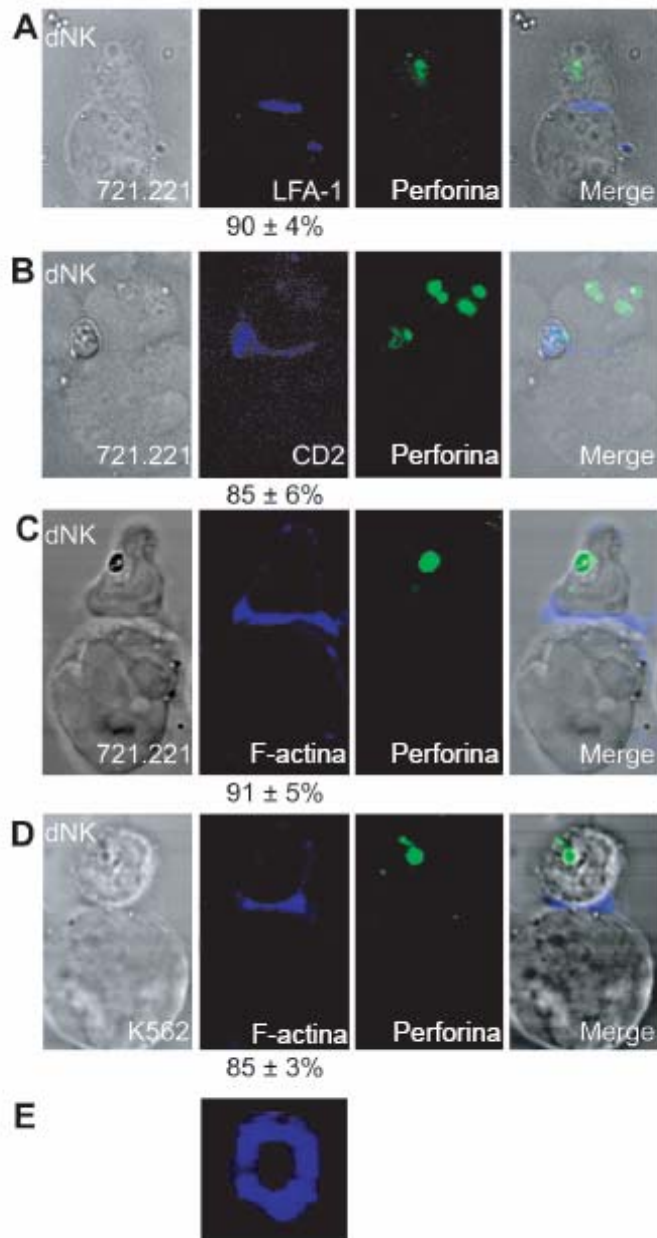


Figura 4.6. Las células dNK forman sinapsis activadoras inmaduras. LFA-1, CD2, F-actina a diferencia de perforina son polarizadas hacia la célula blanco en conjugados formados por células dNK. Las células dNK (células superiores) se muestran conjugadas con células 721.221 (A, B y C) y con células K562 (D) en 4 conjugados distintos. A la izquierda se muestran imágenes de interferencia de contraste diferencial (DIC). En la segunda columna se muestran LFA-1, CD2, o F-actina, (azul). Los números indican el porcentaje de conjugados en los que LFA-1, CD2, o F-actina fueron polarizados. En la tercer columna se muestran los gránulos conteniendo perforina (verde). En la cuarta columna se muestra una superposición de todos los canales fluorescentes y DIC. E) F-actina formando un anillo pSMAC en la NKIS de un conjugado entre células dNK y K562.

El arribo de gránulos citotóxicos al cSMAC es un proceso dependiente del citoesqueleto de microtúbulos que puede bloquearse pre-incubando las células efectoras con colchicina (Orange et al 2003). En las sinapsis formadas por células T de ratón el centro organizador de microtúbulos (MTOC) es polarizado vectorialmente hacia la sinapsis ya formada en el sitio de contacto con la célula blanco (Kuhn y Poenie 2002). Los gránulos citotóxicos, se presume, se mueven a lo largo de los microtúbulos hacia el MTOC polarizado concentrándose así sobre una célula blanco. En células NK el MTOC se localiza en la NKIS activadora (Kupfer et al 1983). En este contexto, la incapacidad de las células dNK de polarizar gránulos conteniendo perforina hacia la células blanco puede bien deberse a una imposibilidad de polarizar el MTOC y por lo tanto los gránulos conteniendo perforina, o bien a una imposibilidad de desplazar los gránulos citotóxicos sobre los microtúbulos hacia el MTOC polarizado.

Para discernir entre estas dos alternativas se analizó por microscopía confocal la distribución del citoesqueleto de microtúbulos y los gránulos conteniendo perforina en células dNK, pNK y YTS (una línea tumoral NK con actividad citotóxica sobre células 721.221) en reposo o formando conjugados con células blanco 721.221. El citoesqueleto de microtúbulos puede visualizarse como una araña por tinción con anticuerpos contra α -tubulina, en cuyo cuerpo, visualizado como una área de tinción densa, se encuentra el MTOC (Figuras 4.7 y 4.8). La localización del MTOC dentro de esta estructura fue confirmada por cotinción con anticuerpos contra γ -tubulina (Figura 4.7. A).

El MTOC y los gránulos conteniendo perforina fueron polarizados hacia la célula blanco en 55% de las células pNK conjugadas con 721.221, y en 74% de las células citotóxicas YTS conjugadas con 721.221 (Figura 4.8.). Es interesante observar que en 98% de las células YTS en reposo y en 95% de las células pNK en reposo, no expuestas a células blanco, los gránulos conteniendo perforina estaban agrupados alrededor del MTOC no polarizados (Figura 4.7. B).

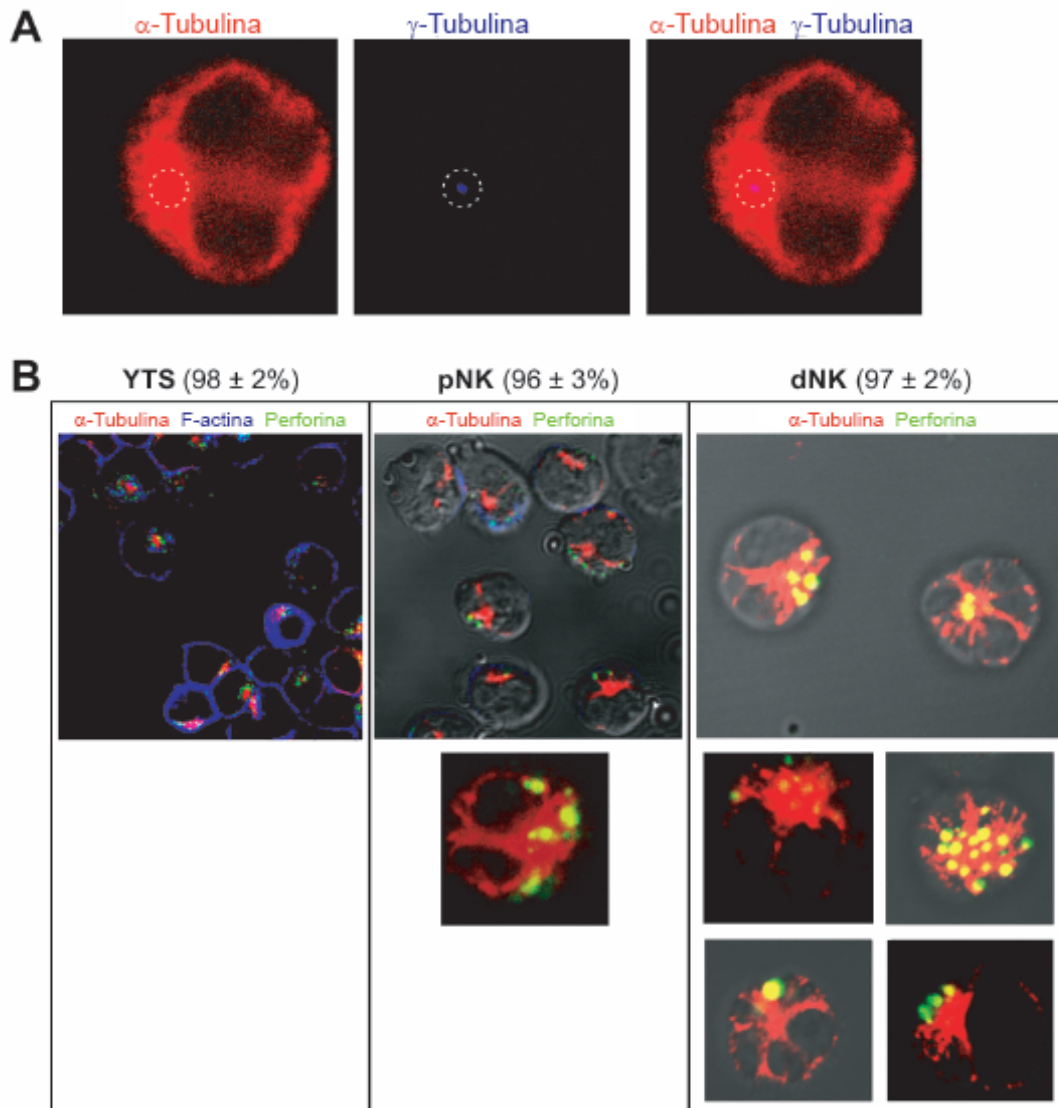


Figure 4.7. Los gránulos conteniendo perforina están distribuidos al rededor del MTOC en células NK en reposo. A) Imagen confocal de una célula YTS mostrando el citoesqueleto de tubulina teñido con anticuerpos anti α -tubulina (rojo). El MTOC fue localizado en el centro de una área densa en α -tubulina por tinción con anticuerpos anti γ -tubulina (punto azul). Una línea de puntos sobresalta la ubicación de γ -tubulina. B) Imágenes confocales de células YTS (panel izquierdo), pNK (panel central) y dNK (panel derecho) sin conjugar. Se muestran α -tubulina (rojo), perforina (verde) y F-actina (azul en el panel izquierdo). El MTOC esta ubicado dentro del área roja densa. Los números inferiores muestran el porcentaje de células NK de cada subtipo NK con gránulos conteniendo perforina agrupados en torno al MTOC

Por lo tanto, en células NK la polarización de gránulos conteniendo perforina hacia el punto de contacto con la célula blanco es muy probablemente simultáneo a y generado por la polarización vectorial del MTOC. Los gránulos conteniendo perforina también se vieron agrupados en torno al MTOC en 97% de las células dNK en reposo no expuestas a células blanco (Figura 4.7. B).

Aproximadamente 80% de las células dNK conjugadas con 721.221 no tenían polarizados los gránulos conteniendo perforina ni el MTOC (Figura 5.8.). El MTOC polarizado junto con gránulos conteniendo perforina se observó en sólo 19% de las células dNK conjugadas. La recuperación de la actividad citotóxica de las células dNK tras la estimulación con IL-15 (Figura 4.1. B) tiene su correlato en el incremento a 66% de las células dNK estimuladas con IL-15 y conjugadas con células 721.221 en las que el MTOC y los gránulos conteniendo perforina fueron polarizados (Figura 4.8) Por lo tanto las células dNK frescas tienen una reducida capacidad citotóxica debido a que fallan en la polarización del MTOC y por lo tanto de gránulos conteniendo perforina hacia la célula blanco.

4.5.Discusión

Un mecanismo fisiológico de supresión de citotoxicidad actúa en las células dNK independizando la polarización del MTOC y de los gránulos citotóxicos de la polarización de los receptores de superficie y la acumulación de F-actina, previniendo así la maduración de sinapsis inmunológicas. La falta de citotoxicidad debido a la falla en la polarización del MTOC ha sido reportada en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de ratones que se caracterizan por su incapacidad de lisar a células tumorales in-vitro. (Radoja et al 2001). Este puede ser un fenómeno más general característico de linfocitos citotóxicos infiltrando tejidos, o bien puede ser que las células tumorales usen mecanismos de inmuno supresión similares a los utilizados por las células de la placenta para

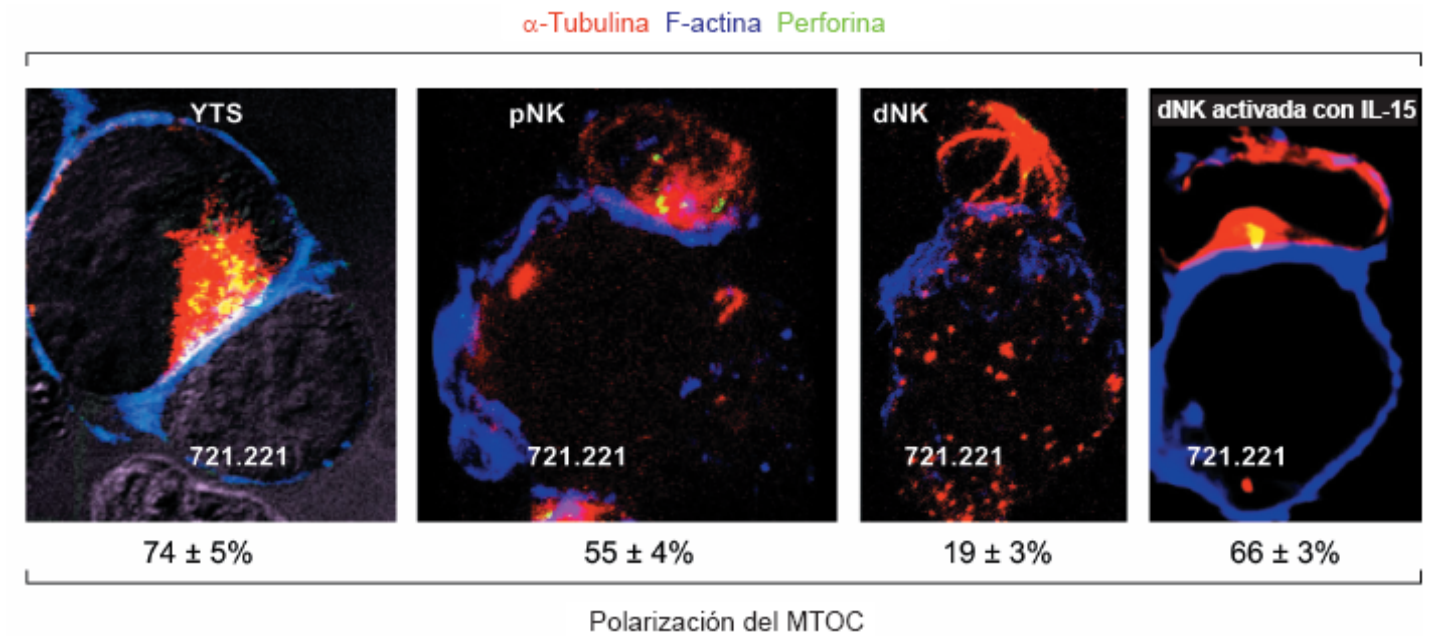


Figura 4.8 Las células dNK, no citotóxicas, fallan en la polarización del MTOC y de gránulos conteniendo perforina hacia el sitio de contacto con la célula blanco como lo hacen las citotóxicas células pNK, YTS, y dNK activadas con IL-15. Imágenes confocales de los conjugados formados por una célula YTS (izquierda), una célula pNK (centro izquierda), una célula dNK (centro derecha) y una célula dNK incubada por 36horas en presencia de IL-15 (derecha) con células 721.221. Las imágenes muestran α -tubulina (rojo), perforina (verde) y F-actina (azul). Los números inferiores representan el porcentaje de conjugados mostrando el MTOC y gránulos conteniendo perforina polarizados hacia el sitio de contacto con la célula blanco.

evadir el rechazo inmune materno. Sin embargo en el caso de los TIL también se ve afectada la polarización de F-actina, que precede a la polarización del MTOC en la maduración de sinapsis (Koneru et al 2005), indicando que los mecanismos responsables de la supresión de citotoxicidad deben diferir en ambos casos .

La interacción de HLA-G, HLA-C y HLA-E, todas moléculas expresadas por trofoblastos , con sus respectivos receptores inhibidores en células NK fue propuesto como otro mecanismo alternativo de inmunosupresión. Sin embargo, las células dNK y pNK no pueden lisar trofoblastos y líneas celulares de trofoblastos aún en presencia de anticuerpos contra moléculas HLA de clase I o contra sus propuestos receptores CD94/NKG2A, ILT, o KIR. (King et al 2000, Avril et al 1999). La reducida polarización de gránulos conteniendo perforina por parte de las células dNK cuando se las compara con células pNK no se vio afectada por la expresión de HLA-G en transfectantes HLA de clase I negativas, o por la exposición a líneas de trofoblastos como JEG-3 y BeWo que expresan HLA-C y HLA-G (Figura 4.5. C). La reducida citotoxicidad de las células dNK frescas sobre células blanco MHC I- negativas (Figura 4.1 A) indica que la falla en la polarización del MTOC y los gránulos citotóxicos es suficiente para inhibir la citotoxicidad de las células dNK.

El mecanismo que previene la polarización del MTOC y los gránulos conteniendo perforina es desconocido en la actualidad. Siendo las células dNK y pNK transcripcionalmente distintas, es posible que las células dNK fallen en la producción o sobre-expresen un factor o proteína vinculado a una eficiente polarización. Siguiendo esta hipótesis , la incubación in-vitro con IL-15 corregiría su nivel de expresión activamente. Alternativamente el ambiente inmunosupresor de la decidua puede ser el responsable de bloquear la polarización del MTOC y los gránulos citotóxicos. Bajo esta

hipótesis la recuperación de la actividad citotóxica de las células dNK se debería a la remoción de las células de dicho ambiente, por ejemplo, al ser incubadas en presencia de IL-15.

Un interrogante por responder es : porque las células dNK tienen gránulos citotóxicos si no son citotóxicas? Los gránulos pudrían existir como mecanismos crípticos de citotoxicidad que podrían activarse bajo las condiciones apropiadas, por ejemplo, la infección de la placenta por citomegalovirus (CMV) o algún otro virus. Se ha demostrado que las proteínas US3 y US6 de CMV disminuyen la expresión de moléculas MHC I en la superficie de trofoblastos (Jun et al 2000). Bajo tales circunstancias , la expresión de las moléculas MHC I no clásicas puede ser importante para proteger trofoblastos no infectados de la actividad citotóxica de células dNK activadas.

Capítulo 5: Galectina 1 y tolerancia materno-fetal

5.1. Introducción. Galectina 1, implantación e inmunosupresión.

Las galectinas constituyen una familia de proteínas cuyos miembros poseen uno o dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con afinidad por β -galactosidos (Cooper 2002, Leffler et al 2004). A través de su unión a carbohidratos las galectinas afectan procesos de adhesión y migración celular, respuestas inmunológicas, apoptosis y secreción de citoquinas (Rubinstein et al 2004a). Quince galectinas han sido identificadas en mamíferos.

Diversas galectinas (galectinas 1, 3, 9, 13 y 15) han sido detectadas en tejido placentario de distintas especies (Hirabayashi J, y Kasai K.1984, van den Brule FA et al 1994, Phillips B et al 1996, Vicovac et al 1998, Than et al 2004, Gray et al 2005, Popovici et al 2005). Sin embargo, por ser las galectinas proteínas secretadas se desconoce el origen celular de las galectina detectadas en placenta.

Los perfiles de transcripción obtenidos por microarrays identifican a galectina 1 como uno de los genes con mayor nivel de sobre-expresión en células dNK humanas en comparación con las células pNK (capítulo 3)

Durante el desarrollo, las primeras células en expresar galectina 1 son las células del trofotodermo (Poirier and Robertson, 1993). El trofotodermo constituye la capa celular exterior del blastocisto pre-implantación que da origen al tejido extraembrionario responsable de interactuar con el tejido materno uterino para soportar el desarrollo exitoso del embrión implantado. La afinidad de galectina 1 por poli-N-acetil lactosaminas, abundantes en el endometrio materno, llevaron a hipotetizar un rol para galectina 1 en el proceso de implantación: Galectina 1 estaría

involucrada en la adhesión de células del trofoblasto al endometrio materno. Sin embargo ratones knock-outs de galectina 1 no mostraron tener comprometida su capacidad reproductiva respecto a ratones salvajes (Poirier and Robertson, 1993). Aún así no debe descartarse que galectina 1 juegue un papel en el proceso de implantación y embarazo. Estos estudios centraron su atención en los procesos de adhesión y migración celular que tienen lugar durante la implantación, y se basaron en cruces de ratones singéneos en los que los aspectos inmunológicos del embarazo quedan enmascarados.

Los efectos inmunosupresores de galectina 1 han sido extensamente estudiados. Galectina 1 forma homodímeros divalentes que al unirse a glicoproteínas multivalentes generan estructuras ordenadas sobre las células a las que se unen. Estas estructuras permiten la segregación y unión de las glicoproteínas originando así respuestas biológicas por parte de las células blanco. De este modo galectina 1 induce inhibición del crecimiento y apoptosis en células T activadas (Perillo et al 1995, Rabinovich et al 2000 y 2002b). Se ha demostrado que galectina 1 inhibe el crecimiento de células T de rata y ratón estimuladas con concanavalina A (Rabinovich et al 1997, Rubinstein et al 2004b) y de células T humanas estimuladas con PHA, así como de células T humanas aloreactivas (Blaser et al 1998, Matarrese et al 2005). Galectina 1 induce también apoptosis de timocitos $CD4^{tenué} CD8^{tenué}$ durante el desarrollo intratímico de linfocitos T (Perillo et al 1997). Se ha descrito la inhibición de la secreción de IL-2, $TNF\alpha$, y $IFN\gamma$ in vitro y la inducción de la secreción de citoquinas de tipo Th2 como IL-5 e IL-10 por células T in-vivo por galectina 1 (Ilarregui et al 2005).

En vista de las propiedades inmunosupresoras de galectina 1 y de su sobre-expresión por células dNK, en este capítulo se analiza la posible contribución a la tolerancia materno fetal humana por parte de galectina 1 producida por las células dNK.

5.2. Las células dNK expresan y secretan galectina 1

Los perfiles de transcripción obtenidos por análisis de microarrays indican que galectina 1 es sobre-expresada por células dNK en comparación con las células pNK CD56^{brillante} y pNK CD56^{tenue}. De acuerdo a estos datos las células dNK contienen 20 veces más mensajeros de galectina 1 que las células pNK CD56^{brillante} y 5 a 10 veces más mensajeros que las células pNK CD56^{tenue} (capítulo 3 figura 3.5). La sobre expresión de galectina 1 por parte de las células dNK a nivel de transcripción fue confirmada por RT-PCR (capítulo 3 figura 3.7).

Con el objeto de evaluar la expresión de galectina 1 por los distintos subtipos de células NK al nivel de proteínas, se realizaron Western blots sobre lisados de células frescas revelando con un anticuerpo monoclonal contra galectina 1. Galectina 1 fue detectada en los lisados de células dNK pero no en los lisados de células pNK CD56^{brillante} o pNK CD56^{tenue} frescas (Figura 5.1).

Se generaron medios condicionados por células dNK y pNK en ausencia de suero y se realizaron ensayos de sándwich ELISA utilizando un anticuerpo policlonal contra galectina 1 con el objeto de determinar si las células dNK son capaces de secretar galectina 1. Para mantener a las células NK vivas los medios fueron suplementados con 12 ng/mL de IL-15 por lo que los niveles de galectina 1 reflejan la secreción de galectina 1 por células NK estimuladas con dicha citoquina. Tras 60 horas de cultivo se detectaron en el orden de 600-700 ng/mL de galectina 1 en los medios condicionados por células dNK pero no en los medios condicionados por células pNK (Figura 5.2). Tras 96 horas de cultivo galectina 1 también fue detectada en los medios condicionados por células pNK, aunque a niveles significativamente inferiores a los producidos por células dNK.

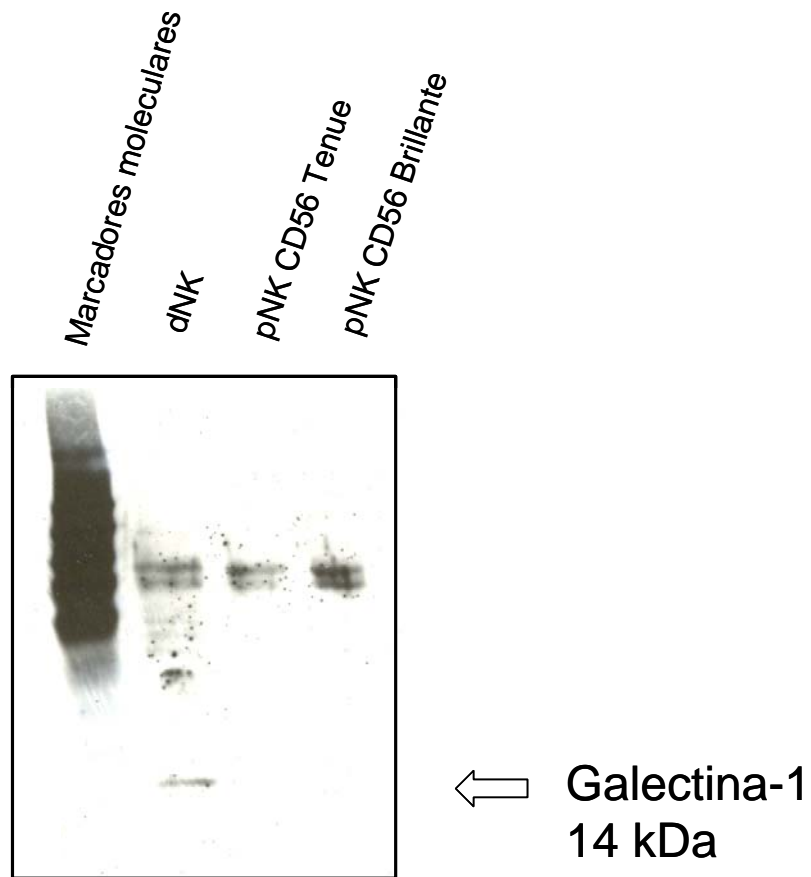


Figura 5.1. Galectina 1 es expresada por células dNK pero no por células pNK frescas. Western blot de lisados de células dNK , pNK CD56^{Brillante} y pNK CD56^{Tenue} frescas revelado con el anticuerpo monoclonal contra galectina 1 NCL GAL-1. Galectina 1 es visualizada como una banda de 14 kDa.

Secreción de Galectina 1

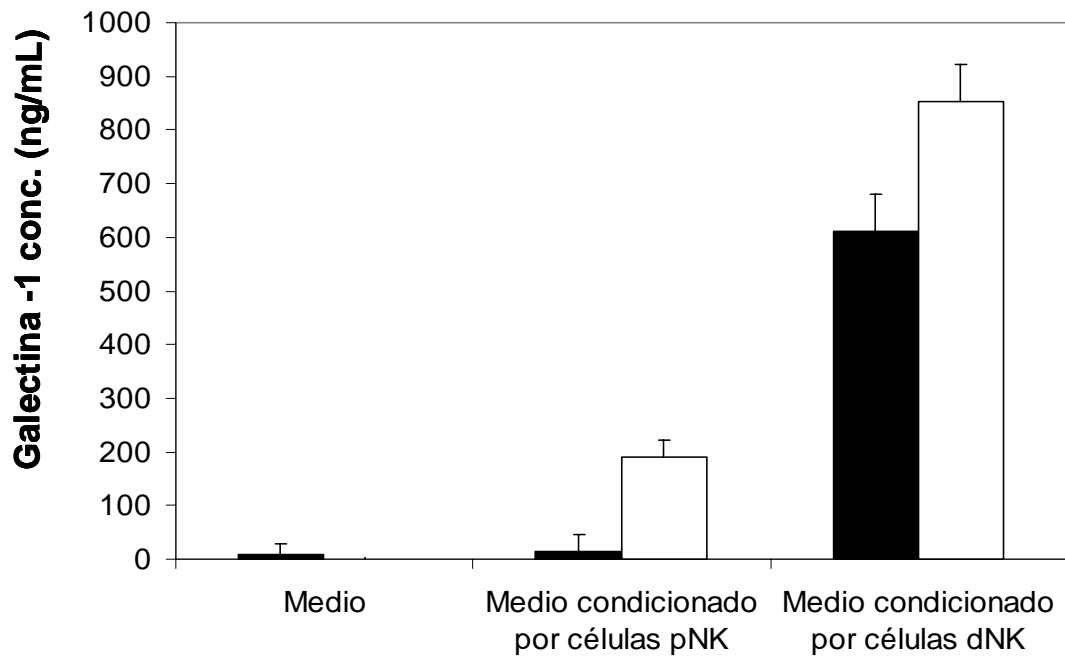


Figura 2. Galectina 1 es secretada diferencialmente por células dNK. Concentración de galectina 1 en medio sin suero condicionado por células dNK y pNK durante 60 horas (barras llenas) y 96 horas (barras vacías). Los cultivos se realizaron en presencia de 12ng/mL de IL-15. La detección de galectina 1 se realizó por ensayos de ELISA con un anticuerpo policlonal contra galectina 1 como se detalla en el capítulo 2, Materiales y Métodos.

5.3. Efectos de galectina 1 sobre células NK

Galectina 1 posee efectos inmunosupresores entre los que se encuentran la inhibición de alorrespuestas por células T y la inducción de apoptosis sobre linfocitos T CD8 activados (Perillo et al 1995, Rabinovich et al 2002 b)). La inducción de apoptosis por galectina 1 es dependiente de la expresión de C2GNT por los linfocitos T CD8 activados. C2GNT inicia una segunda ramificación sobre O-glicanos que es luego alongada con polilactosaminas (Lowe 2001, Daniels et al 2002). Glicoproteínas de superficie como CD45, CD43, CD7, CD2 presentan estas estructuras en la superficie de las células T CD8 activadas. Homodímeros divalentes de galectina 1 se unen a los residuos de polilactosaminas generando estructuras que afectan el agrupamiento o segregación de las glicoproteínas de superficie induciendo los efectos inmunosupresores sobre células T (Pace et al 1999, Pace et al 2000).

Dado que los perfiles de transcripción obtenidos por análisis de microarrays revelan la expresión de C2GNT en células dNK frescas (ver capítulo 3 figura3 a) existe la posibilidad de que la reducida actividad citotóxica de las células dNK respecto de las células pNK sea un efecto inducido por la unión de galectina 1 a glicoproteínas O-glicosiladas en la superficie de las células dNK. Se evaluó la capacidad de galectina 1 de reducir la actividad citotóxica de células NK. Dado que las células dNK frescas poseen una reducida actividad citotóxica, los efectos inhibidores de galectina 1 sobre la citotoxicidad de células NK fueron ensayados sobre células pNK pre-activadas durante 5 días con IL-15, asumiendo, por analogía a lo observado en células T, que su activación las volvería susceptibles a galectina 1. Galectina 1 inhibió en forma dosis dependiente la actividad lítica de las células pNK activadas con IL-15 sobre células K562, blanco clásicos de células NK (Figura 5.3).

Se evaluó también, por tinción con Anexina V, la susceptibilidad de las células pNK activadas con IL-15 a la inducción de apoptosis por galectina 1. Se incubaron primero las células

con 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de galectina 1 en presencia de 1mM DTT a 37°C durante distintos lapsos de tiempo tras los cuales la inducción de apoptosis fue interrumpida por la adición de lactosa 100 mM, las células fueron lavadas y teñidas con anexina V. En estas condiciones la máxima inducción de apoptosis se alcanzó tras 30 minutos de incubación (Figura 5.4 A y B). Con este tiempo de incubación galectina 1 indujo apoptosis de las células pNK activadas en forma dosis dependiente (Figura 5.4. C).

En repetidos experimentos en los que la capacidad citotóxica y la inducción de apoptosis se evaluaron sobre un mismo pool de células pNK activadas con IL-15 e incubadas por 30 minutos en presencia de distintas concentraciones de galectina 1 y 1 mM DTT, no fue posible dissociar los efectos de inducción de apoptosis e inhibición de citotoxicidad. Por consiguiente la inhibición en la actividad citotóxica de células pNK activadas es probablemente una consecuencia de la inducción de apoptosis por galectina 1.

Se evaluó también por tinción con anexina V la inducción de apoptosis por galectina 1 en células pNK en reposo, células pNK activadas con IL-2 y células dNK. Las células pNK activadas con IL-2 resultaron susceptibles a la inducción de apoptosis por galectina 1. Sorprendentemente las células pNK frescas no activadas también resultaron susceptibles a la inducción de apoptosis por galectina 1 contrariamente a lo observado y reportado para células T que deben ser activadas para ser susceptibles a los efectos apoptóticos de galectina 1 (Figura 5.5 y Perillo et al 1995). Este resultado fue inesperado dado que los perfiles de expresión obtenidos por microarrays mostraron la falta de expresión de C2GNT por parte de las células pNK.

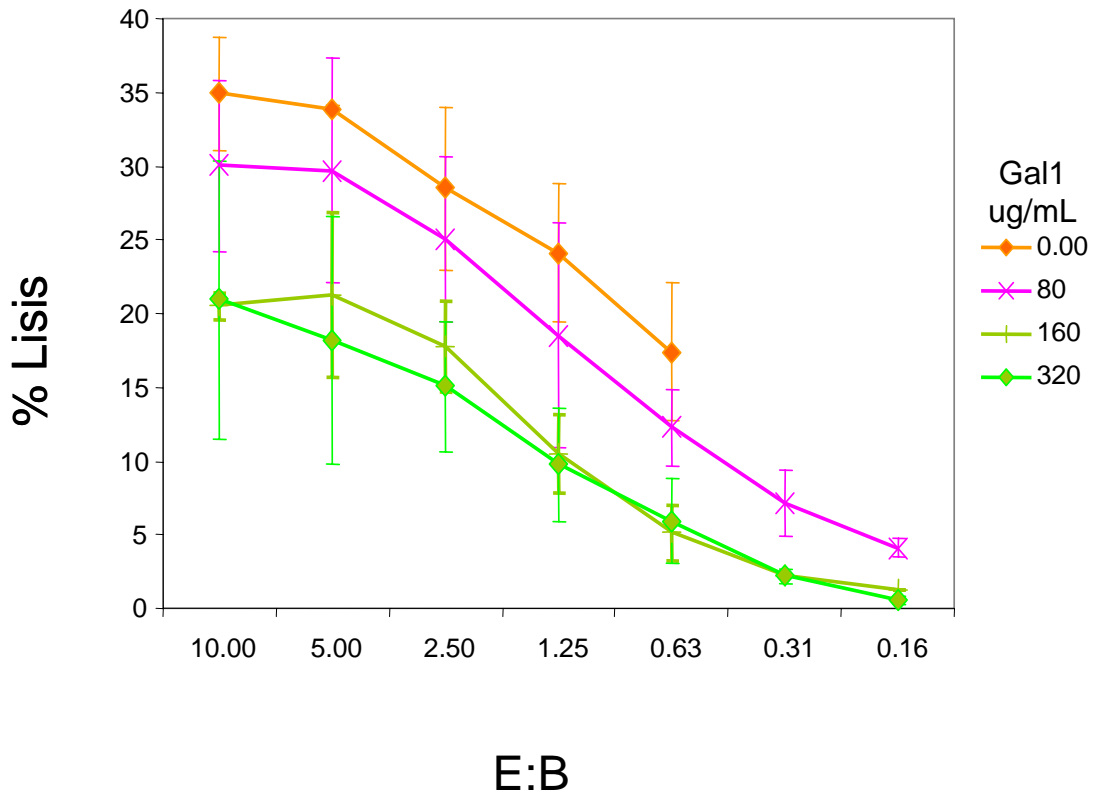


Figura 5.3. Galectina 1 inhibe la actividad citotóxica de células pNK activadas con IL-15 sobre células K562. Ensayo de liberación de ^{51}Cr usando células pNK incubadas durante 5 días en presencia de 12 ng/mL de IL-15 como células efectoras. Las células fueron preincubadas con distintas concentraciones de galectina 1 en presencia de 1mM DTT durante 30 min a 37°C y lavadas 3 veces con medio de cultivo antes de ensayar su actividad citotóxica sobre células K562. (E:B tasa de células efectoras a células blanco).

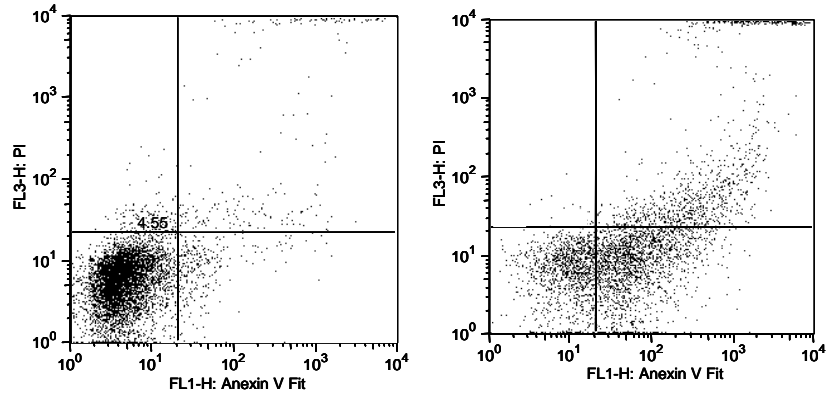
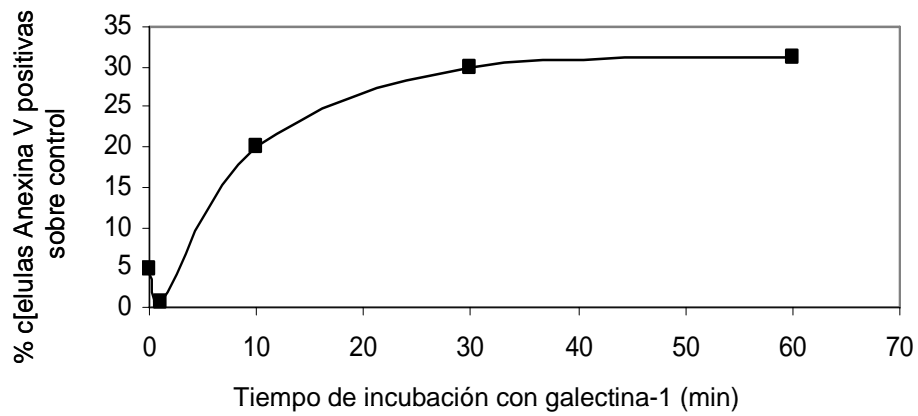
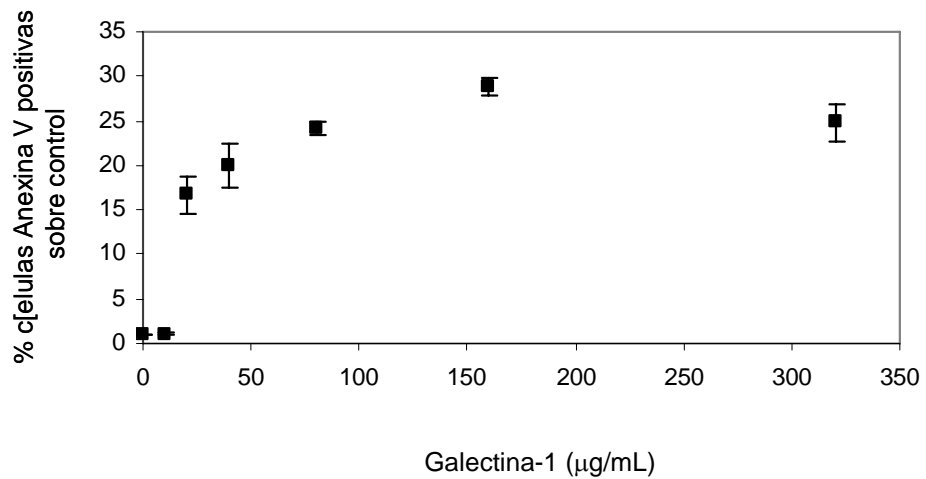
A**B****C**

Figura 5.4 Galectina 1 induce apoptosis de células pNK activadas con IL-15. A) Tinción con anexina V de células pNK activadas durante 5 días en presencia de 12 ng/mL IL-15 e incubadas con (derecha) o sin (izquierda) 320 $\mu\text{g/mL}$ de galectina 1 durante 30 minutos B) Las células fueron incubadas con 320 $\mu\text{g/mL}$ de galectina 1 por distintos lapsos de tiempo. C) Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de galectina 1 por 30 minutos. En todos los casos las incubaciones con galectina 1 se realizaron a 37°C en presencia de 1mM DTT tras lo cual la inducción de apoptosis fue interrumpida por la adición de 100mM lactosa. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y teñidas con anexina V.

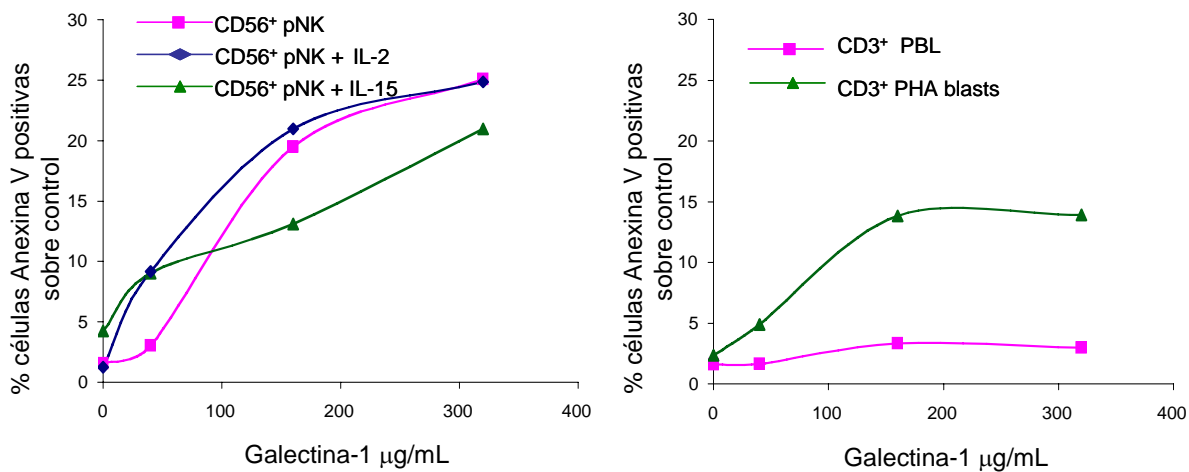


Figura 5.5. A diferencia de las células T las células pNK son susceptibles a la inducción de apoptosis por galectina 1 sin requerir ser activadas. Preparaciones de células enriquecidas en células pNK frescas o activadas por 5 días con 100 unidades/mL de IL-2 o 12 ng/mL de IL-15 (izquierda) y PBLs frescos o activados por 5 días con PHA y 200 unidades/mL de IL-2 (derecha) fueron expuestas a distintas concentraciones de galectina 1 en presencia de 1mM DTT durante 30 min a 37°C. La inducción de apoptosis fue interrumpida por la adición de 100mM lactosa. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS, teñidas con anticuerpos contra CD56 o CD3 sobre hielo y luego lavadas y teñidas con anexina V.

5.4. Anexina V revela una población apoptótica de linfocitos T de decidua humana

Las células dNK frescas también resultaron susceptibles a la inducción de apoptosis por galectina 1 (Figura 5.6. A). Sin embargo la tinción con anexina V de linfocitos totales frescos de decidua muestra que los linfocitos CD56⁺ son, en su mayoría, no apoptóticos. Interesantemente en las mismas preparaciones se observó una población de linfocitos frescos de decidua CD56⁻ que resultaron positivos en la tinción con Anexina V (Figura 5.6 A). Esta población está constituida por linfocitos T según se los identificó por co-tinción con anticuerpos anti-CD3 (Figura 5.6. A y B). Contrariamente no se observó un perfil apoptótico en linfocitos CD3⁺ periféricos de sangre expuestos a un protocolo de aislamiento simulado similar al utilizado para obtener linfocitos totales de decidua, descartando que el perfil apoptótico de los linfocitos CD3⁺ de decidua sea artificialmente generado por el procedimiento de aislamiento utilizado (Figura 5.6 B). El estado apoptótico de los linfocitos T de decidua se verificó también por TUNEL (deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) (Figura 5.6 C) aunque en este caso, debido al bajo número de linfocitos CD3⁺ presentes en la decidua, y al extenso número de lavados realizados en el ensayo de TUNEL, fue necesario aislar primero a los linfocitos T y luego realizar sobre ellos, o sobre linfocitos totales como control, el ensayo de TUNEL.

5.5. Medio condicionado por células dNK induce apoptosis sobre células T activadas y células MOLT4

La presencia de células T de decidua apoptóticas y la secreción de galectina 1 por parte de células dNK sugiere la posibilidad de que las células dNK, mediante la secreción de galectina 1, contribuyan a la generación de un ambiente inmunosupresor en la interfase materno-fetal que proteja de la actividad de linfocitos T activados a las células fetales hemialogeneicas. Consiguientemente se

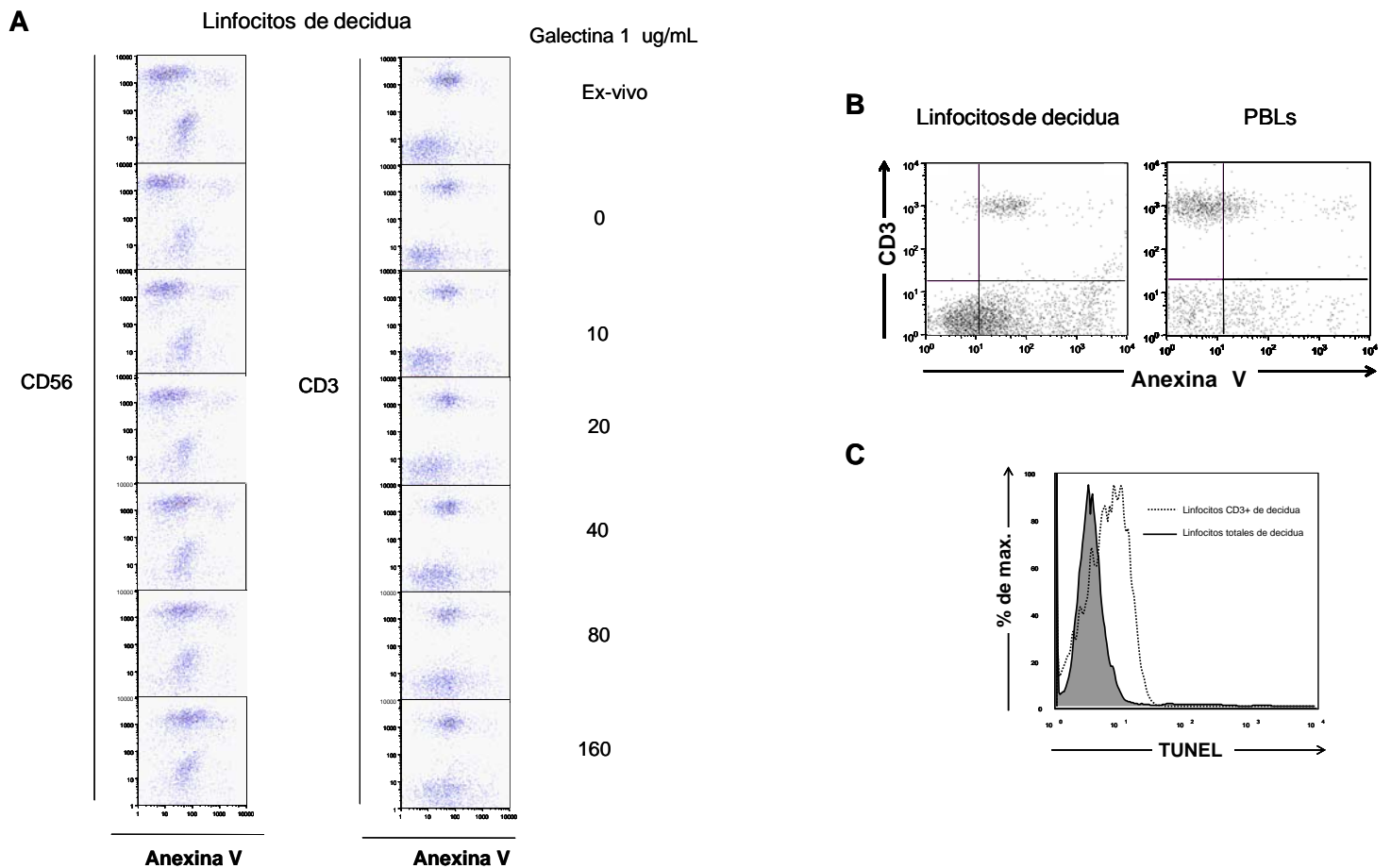
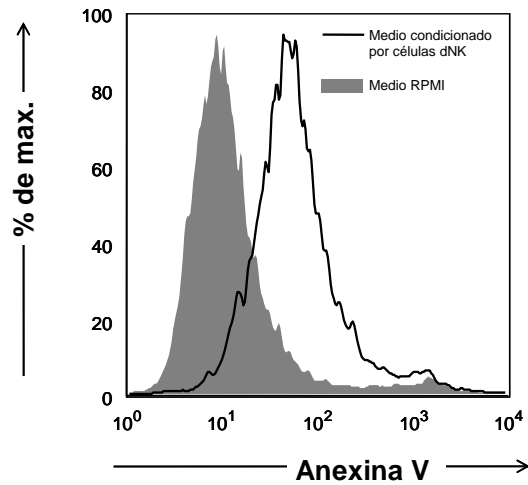


Figure 5.6. Linfocitos frescos de decidua contienen una población de linfocitos T apoptóticos. A) Tinción con Anexina V y anticuerpos anti-CD56 (izquierda) o anti-CD3 (derecha) de una misma preparación de linfocitos de decidua frescos (ex vivo) o tratados con distintas concentraciones de galectina 1 en presencia de 1mM DTT. Nótese la presencia de una población de linfocitos frescos CD56- y CD3+ , positivos en la tinción con anexina V . B) Tinción de linfocitos frescos de decidua (izquierda) y PBLs (derecha) con anexina V y anticuerpos anti-CD3. Los PBLs fueron sometidos a un procedimiento de aislamiento simulado similar al empleado para obtener linfocitos de decidua. B) TUNEL de linfocitos totales de decidua (histograma sombreado) y células T (CD3+) de decidua (histograma vacío)

evaluó, por tinción con Anexina V, la capacidad de medios condicionados por células dNK de inducir apoptosis sobre células T activadas y una línea de células T (MOLT4) susceptible a la inducción de apoptosis por galectina 1. El medio condicionado por células dNK indujo, en forma dosis dependiente, apoptosis de células MOLT 4 (Figura 5.7 A y B) y de células T periféricas pre-activadas por 5 días con PHA en presencia de IL-2 (Figura 5.7 C). La inducción de apoptosis por el medio condicionado sobre células T activadas con PHA resultó en un porcentaje de células apoptóticas similar al máximo porcentaje de células apoptóticas alcanzado por incubación con galectina 1 recombinante. Interesantemente la inducción de apoptosis sobre células MOLT4 resultó mayor con medios condicionados por células dNK que con galectina 1 recombinante (Figura 5.7. B).

Con el objeto de identificar si la capacidad apoptótica de los medios condicionados por células dNK se debe de hecho a la presencia de galectina secretada por las células dNK, se buscó bloquear el efecto apoptótico de los medios con 50mM Lactosa, un disacárido que compite la unión de galectina 1 a residuos de polilactosamina presentes en las glicoproteínas de superficie de células T activadas y líneas de células T como MOLT4. La lactosa bloqueó la inducción de apoptosis de células MOLT4 tanto por galectina 1 recombinante como por los medios condicionados (Figura 5.8) indicando que la galectina 1 secretada por las células dNK, o tal vez alguna otra galectina presente en los medios condicionados, es responsable de la actividad apoptótica de los medios condicionados por células dNK.

A



B

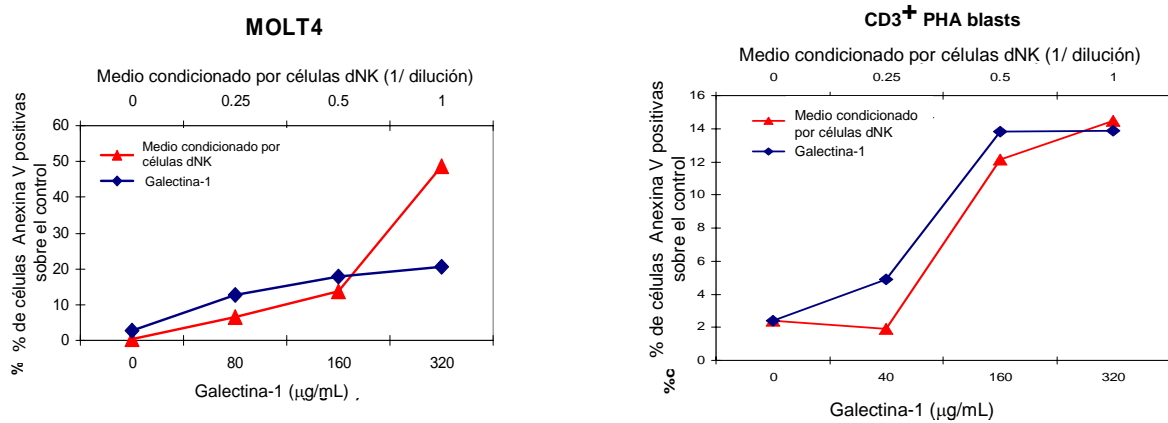


Figura 5.7. Medio condicionado por células dNK induce apoptosis de células T activadas y células MOLT4. A) Tinción con Anexina V de células MOLT4 tratadas o sin tratar con medio condicionado por células dNK. Las células MOLT4 fueron expuestas a medio RPMI o a medio condicionado por células dNK fresco en presencia de 1mM DTT durante 30 minutos a 37°C. B) Tinción con Anexina V de células MOLT4 (izquierda) o de linfocitos periféricos de sangre (PBLs) activados por 5 días con PHA y IL-2 (derecha) expuestos a distintas concentraciones de galectina 1 recombinante o a diferentes diluciones de medio condicionado por células dNK fresco en presencia de 1mM DTT durante 30 minutos a 37°C. Para los PBLs activados con PHA las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD3 a 0°C antes de ser expuestas a anexina V. En el análisis por FACS de los PBLs se aplicó un filtro para considerar solo células CD3⁺. Se muestra el porcentaje diferencial de células apoptóticas en cada muestra respecto de un control no tratado (un experimento representativo de 3).

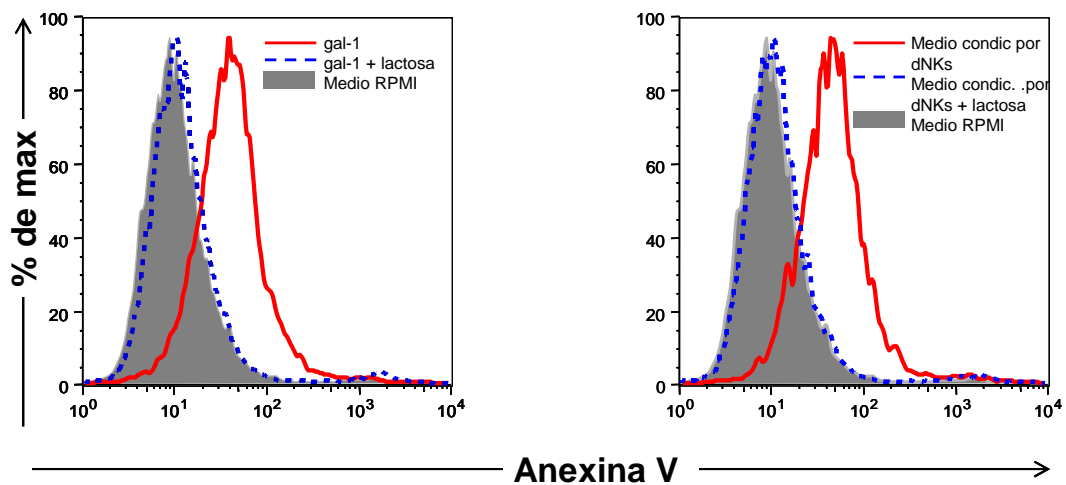


Figura 5.8. Galectina 1 es el factor responsable de las propiedades proapoptóticas del medio condicionado por células dNK. Tinción con Anexina V de células MOLT4 incubadas 30 min a 37°C con galectina 1 recombinante (izquierda) o medio condicionado por células dNK fresco (derecha), con (histograma azul) o sin (histograma rojo) el agregado de 50mM lactosa. Como control se incubaron las células con medio RPMI 1640 contenido 10% de suero fetal bovino (histograma gris) .

5.6. Discusión.

Los datos presentados en este capítulo apoyan la hipótesis de que las células dNK contribuyen a la generación de un ambiente inmunosupresor en la interfase materno-fetal, entre otros mecanismos, a través de la secreción de galectina 1. Las células dNK, a diferencia de las células pNK, expresan y secretan galectina 1 in-vitro. Galectina 1 tiene la capacidad de inducir apoptosis en células T activadas mientras que una proporción importante de los linfocitos CD3⁺ aislados de decidua presenta un perfil apoptótico. Los medios condicionados por células dNK poseen la capacidad de inducir apoptosis de células T activadas y de células MOLT4. La capacidad apoptótica de los medios condicionados puede ser bloqueada por lactosa al igual que la capacidad apoptótica de galectina 1.

La inducción de apoptosis de células T con galectina 1 recombinante se alcanza con concentraciones del orden de 100 µg/mL de la proteína (figura 5.5. y Perillo et al 2005, He y Baum 2004), mientras que los medios condicionados por células dNK poseen una capacidad apoptótica similar o superior, conteniendo sólo cantidades del orden de 1 µg/mL de galectina 1. Es posible que otra u otras proteínas secretadas por las células dNK sinergicen el efecto apoptótico de la galectina secretada por las células dNK. En tal sentido sería interesante estudiar si este no es el caso de PP14, una glicoproteína sobre expresada por células dNK (ver capítulo 3) que comparte propiedades inmunosupresoras con galectina 1. Al igual que galectina 1, PP14 puede inducir apoptosis de células T (Mukhopadhyay et al 2001), colocaliza con CD45 en las células a las que se une (Rachmilewitz et al 2003), y reacciona con N-acetilactosaminas (Ish-Shalom et al 2006). Interesantemente, PP14, en la forma glicosilada en que se presenta en mujeres, posee residuos de polilactosamina (Dell et al 1995) a los que galectina 1 podría en teoría unirse.

Recientemente se ha reportado que para inducir apoptosis de la línea de células T PhaR2.1, si galectina 1 es presentada a las células blanco unida a proteínas de matriz extracelular, se requiere una concentración de galectina 1 diez veces menor a la que se requiere si se usa galectina 1 en solución (He y Baum 2004) . Es posible que en la decidua, galectina 1 se una a glicoproteínas de superficie o a proteínas de la matriz extracelular inmediatamente después de ser secretada, para ser presentada de esta forma a células T activadas. Muy probablemente, la concentración efectiva de galectina 1 en el entorno de las células secretoras en el tejido de decidua sea además considerablemente superior al detectado en los medios condicionados.

Galectina 1 posee además capacidad de inducir apoptosis de células NK . A diferencia de las células T, la inducción de apoptosis de células NK por galectina 1 no requiere de la preactivación de las células según lo muestra la tinción de las células con Anexina V. Las células dNK humanas también resultaron susceptibles a la inducción de apoptosis por galectina 1 despertando el interrogante de que es lo que las diferencia de las células T de decidua para no presentar un perfil apoptótico ex vivo.

En última instancia la comprobación de lo que aquí se propone, que galectina-1 producida por células dNK contribuye a la inmunotolerancia materno fetal induciendo apoptosis de células T aloreactivas, requerirá de experimentación con modelos animales. Los mismos deberían contemplar la posibilidad de que múltiples galectinas presentes en la decidua se complementen unas a otras.

6. Conclusiones

En esta tesis se ha provisto una caracterización detallada de los perfiles de expresión de genes de los distintos subtipos de células NK de sangre periférica y de tejido de decidua y de la capacidad citotóxica de estas últimas.

Primero, las células dNK son remarcablemente diferentes de cualquiera de los dos subtipos de células pNK: las células pNK CD56^{brillante} son mucho más parecidas a las células pNK CD56^{tenue} de lo que se parecen a las células dNK CD56^{brillante}.

Segundo, la mayor parte de los genes expresados diferencialmente son sobre-expresados por las células dNK. Contrastando con ello el número relativamente pequeño de genes sobre-expresados por células pNK se distribuye en cantidades iguales entre los que son sobre-expresados en pNK CD56^{tenue} vs. pNK CD56^{brillante} y los que son sobre-expresados por células pNK CD56^{brillante} versus pNK CD56^{tenue}. Las diferencias observadas en los perfiles de expresión pueden ser explicadas por dos hipótesis alternativas: (a) las células dNK constituyen una línea distinta de las células pNK teniendo su origen posiblemente en un precursor hematopoiético distinto, o (b) las diferencias reflejan la maduración de células pNK (CD56 brillante o tenue) en el micro-ambiente de la decidua. Adicionalmente, la naturaleza de los precursores y sitios de diferenciación de células dNK, y en particular los efectos de hormonas y células de estroma de decidua resultan de considerable interés. Ha de prestarse atención a los efectos comunes de varios estromas, y a los posibles efectos específicos que pueden llevar a la expresión de moléculas específicas de células dNK.

Tercero, las células dNK poseen reducida su capacidad citotóxica. Mientras las células dNK son capaces de formar sinapsis inmunológicas inmaduras, se ven imposibilitadas de polarizar el MTOC y gránulos citotóxicos hacia las sinapsis formadas con las células blanco. Las causas de este

fenómeno pueden ser buscadas en las diferencias estructurales a nivel de la expresión de genes entre las células dNK y las células pNK, o bien pueden deberse a factores presentes en la decidua que inhiban activamente la actividad citotóxica de las células dNK.

Cuarto, y más interesantemente, las células dNK sobre-expresan genes que abren nuevos caminos de investigación al problema sin resolver de la inmunotolerancia materno fetal. Estos genes incluyen CD9 y otras tetraspaninas, al menos 4 subunidades de integrinas, NKG2C y NKG2E, Ly-49L, KIRs, galectina 1, PSG11 y PP14, todos ellos con potenciales funciones inmunomoduladoras en el embarazo.

Quinto, galectina 1 es secretada por células dNK in vitro. Galectina 1 induce apoptosis de células T activadas, y como aquí se muestra, de células NK. Una importante proporción de linfocitos CD3+ frescos de decidua posee un perfil apoptótico. Los medios condicionados por células dNK poseen capacidad de inducir apoptosis de células T activadas. Al igual que la actividad apoptótica de galectina 1 sobre células T activadas, la actividad apoptótica de los medios condicionados puede bloquearse con lactosa, sugiriendo que la producción de galectina por las células dNK podría contribuir a la protección del feto de células T maternas aloreactivas.

Los datos aquí presentados sugieren una función particular para las células dNK, un rol en la inmunotolerancia materno-fetal

7. Referencias

Allan, D.S., Colonna M., Lanier L.L., Churakova T.D., Abrams J.S., Ellis S.A., McMichael A.J. and Braud V.M.. 1999. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 189:1149–1156.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004 Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.*;5(3):266-71

Anderson, D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D. and Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 390:175–179.

Anderson P., Caligiuri M., Ritz J. and Schlossman S.F. 1989. CD3-negative natural killer cells express ζ TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341:159–62

Arnold, L.L., Doherty T.M., Flor A.W., Simon J.A., Chou J.Y., Chan W.Y. and Mansfield B.C. 1999. Pregnancy-specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potential correlation to interleukin-10 expression. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41:174–182.

Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A. and Mandelboim, O. 2001 Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30, *Eur. J. Immunol.* 31 2680–2689.

- Avril, T., Jarousseau, A. C., Watier, H., Boucraut, J., Le Bouteiller, P., Bardos, P. and Thibault, G. 1999. Trophoblast Cell Line Resistance to NK Lysis Mainly Involves an HLA Class I-Independent Mechanism *J. Immunol.* 162, 5902–5909
- Barten, R. and Trowsdale, J. 1999. The human Ly-49L gene. *Immunogenetics.* 49:731–734
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. 1999. Activation of natural killer cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727–30
- Baugh, L.R., Hill, A.A., Brown, E.L. and Hunter, C.P. 2001. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.*29:E29.
- Blanca, I.R., Bere, E.W., Young, H.A. and Ortaldo J.R. 2001. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5⁺ B cells, *J. Immunol.* 167. 6132–6139
- Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. 1998 β -galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 28:2311–19.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C. and Moretta, A. 2001 Human natural killer cell receptors and co-receptors, *Immunol. Rev.* 181 203–214.

Billadeau, D.D., Upshaw, J.L., Schoon, R.A., Dick, C.J. and Leibson, P.J. 2003. NKG2DDAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat. Immunol.* 4:557–64

Billingham, R.E., Brent, L. and Medawar, P.B. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature.* 172:603

Bohn, H. and Weinmann, E. 1974. Immunological disruption of implantation in monkeys with antibodies to human pregnancy specific beta 1-glycoprotein (SP1) (author's transl). *Arch. Gynakol.* 217:209–218.

Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1(CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198:557–67

Boyson, J.E., Rybalov, B., Koopman, L.A., Exley, M., Balk, S.P., Racke, F.K., Schatz, F., Masch, R., Wilson, S.B. and Strominger, J.L. 2002. a. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 13741–13746.

Boyson, J.E., Erskine, R., Whitman, M.C., Chiu, M., Lau, J.M., Koopman, L.A., Valter, M.M., Angelisova, P., Horejsi, V. and Strominger, J.L. 2002 b. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:16180–16185.

Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L.L., McMichael, A.J. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795–799.

Brown, M.H., Boles, K., Anton van der Merwe, P., Kumar, V., Mathew, P.A., Barclay, N.A. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188:2083–90

Bulmer, J.N., Hollings, D. and Ritson, A. 1987. Immunocytochemical evidence that endometrial stromal granulocytes are granulated lymphocytes. *J. Pathol.* 153:281–288

Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K.E., Hodge, M.R., Wu, L. and Butcher, E.C. 2001. Unique subpopulations of CD56 NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 166:6477–6482

Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M. and Bordo, D. 2003. The three-dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity, *Structure* 11: 725–734.

Carretero, M., Llano, M., Navarro, F., Bellon, T. and Lopez-Botet, M. 2000. Mitogen-activated protein kinase activity is involved in effector functions triggered by the CD94/ NKG2-C NK receptor specific for HLA-E. *Eur. J. Immunol.* 30:2842–2848.

Carson, W.E., Fehniger, T.A. and Caligiuri, M.A. 1997. CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.* 27:354–360.

Colonna, M., Borsellino, G., Falco, M., Ferrara, G.B. and Strominger, J.L. 1993. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance or lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:12000–12004.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A. and Caligiuri, M.A. 2001. a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633-640.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaehri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E. and Caligiuri, M.A. 2001. b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 97:3146–3151.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Ponnappan A., Mehta V., Wewers, M.D. and Caligiuri M.A. 2001 c. Interleukin-1betacostimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 31:792–801.

Cooper, D.N.W. 2002 Galectinomics: Finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 1572:209–31.

Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123–33

Cross, J.C., Werb, Z. and Fisher, S. J. 1994 Implantation and the placenta : key pieces of the development puzzle. *Science* 266 ,1508-18.

Croy, B.A., Chantakru, S., Esadeg, S., Ashkar, A.A. and Wei, Q. 2002. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *J. Reprod. Immunol.* 57:151– 168.

Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H. and Thibault, G. 2004 Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 64 4664–4669.

Daniels, M.A., Hogquist, K.A. and Jameson, S.C. 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* 3:903–910.

Davis, D. M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G. B., Mandelboim, O. and Strominger, J. L. 1999. The human natural killer cell immune synapse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15062–15067

Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF. 1995 Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodefin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J Biol Chem.*;270(41):24116-26

Deniz, G., Christmas, S.E., Brew, R. and Johnson, P.M. 1994. Phenotypic and functional cellular differences between human CD3- decidual and peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.* 152:4255– 4261.

Dorner, B.G., Smith, H.R., French, A.R., Kim, S., Poursine-Laurent, J., Beckman, D.L., Pingel, J.T., Kroczek, R.A. and Yokoyama, W.M. 2004. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection, *J. Immunol.* 172:3119–3131.

Dobrovina ES, Dobrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, Vyas YM. 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.* 171:6891–99

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:14863–14868.

Faulk, W.P., and Temple, A. 1976. Distribution of beta2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature.* 262:799–802.

Fisher, R.C. and Thorley-Lawson, D.A. 1991. Characterization of the Epstein–Barr virus-inducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48), *Mol. Cell. Biol.* 11:1614–1623.

Frey, M., Packianathan, N.B., Fehniger, T.A., Ross, M.E., Wang, W.C., Stewart, C.C., Caligiuri, M.A. and Evans S.S. 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. *J. Immunol.* 161:400–408.

Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U. and Ferrara, G.B. 2002.

Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 19;196(4):459-68.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J. and Raulet, D.H. 2005 The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature.* 436: 1186-90.

Gimferrer, I., Farnos, M., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Enrich, C., Sanchez-Madrid, F., Vives, J. and Lozano, F. 2002. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of T lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 278:8564–8571.

Gray CA, Dunlap KA, Burghardt RC, Spencer TE. 2005 Galectin-15 in ovine uteroplacental tissues. *Reproduction.* 2005 Aug;130(2):231-40.

Groh, V., Wu, J., Yee, C. and Spies, T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734–38

Guleria, I., Khosroshahi, A., Ansari, M.J., Habicht, A., Azuma, M., Yagita, H., Noelle, R.J., Coyle, A., Mellor, A.L., Khoury, S.J. and Sayegh, M.H. 2005. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med.* 2, 231-237

Guethlein, L.A., Flodin, L.R., Adams, E.J. and Parham, P. 2002. NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Igl-like receptors with MHC-C. *J. Immunol.* 169:220–229.

He, J. and Baum, L.G. 2004. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers Tcell death. *J Biol Chem* 279:4705–12.

Hemler, M.E. 2001. Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155:1103–1107.

Hibbs ML, Selvaraj P, Carpen O, Springer TA, Kuster H, Jouvin MH, Kinet JP. 1989. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc γ RIII (CD16). *Science* 246:1608–11

Hiby, S.E., King, A., Sharkey, A.M. and Loke, Y.W. 1997. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol. Immunol.* 34:419–430.

Hiby, S.E., Walker, J.J., O'shaughnessy, K.M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J. and Moffett, A. 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 200(8):957-65

Hirabayashi J, Kasai K. 1984 Human placenta beta-galactoside-binding lectin. Purification and some properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 16;122(3):938-44.

Hokland, M. and Kuppen, P.J. 2005. Natural killer cells: from “disturbing” background to central players of immune responses, *Mol. Immunol.* 42, 381–383

Illarregui, J.M., Bianco, G.A., Toscazo, M.A. and Rabinovich, G.A. 2005 . The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 64:iv96–iv103.

Ish-Shalom E, Gargir A, Andre S, Borovsky Z, Ochanuna Z, Gabius HJ, Tykocinski ML, Rachmilewitz J, 2006. alpha2,6-Sialylation promotes binding of placental protein 14 via its Ca²⁺-dependent lectin activity: insights into differential effects on CD45RO and CD45RA T cells. *Glycobiology*. 16(3):173-83

Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W. and Schmidt, R.E. 2001. CD56 bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31:3121– 3127.

Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R. and Raulet, D.H. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17:19–29

Jan Chalupny, N., Sutherland, C.L., Lawrence, W.A., Rein-Weston, A., Cosman, D. 2003. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:129–35

Julkunen, M., Seppala, M. and Janne, O.A. 1988. Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to betaactoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8845–8849.

Jun, Y., Kim, E., Jin, M., Sung, H.C., Han, H., Geraghty, D.E. and Ahn, K. 2000 Human Cytomegalovirus Gene Products US3 and US6 Down-Regulate Trophoblast Class I MHC Molecules *J. Immunol.* 164, 805–811

Kazarov, A.R., Yang, X., Stipp, C.S., Sehgal, B. and Hemler, M.E.. 2002. An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J. Cell Biol.* 158:1299–1309.

King, A., Birkby, C. and Loke, Y.W. 1989. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell. Immunol.* 118:337–344.

King, A., Wooding, P., Gardner, L. and Loke, Y.W. 1993. Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum. Reprod.* 8, 2061–2067.

King, A., Burrows, T., and Loke, Y.W. 1996 a Human uterine natural killer cells. *Nat. Immun.* 15(1) 41-52.

King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A.G. and Loke, Y.W. 1996 b. Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J. Immunol.* 156:2068–2076.

King, A., Gardner, L., Sharkey A. and Loke, Y.W. 1998. Expression of CD3 epsilon, CD3 zeta, and RAG-1/RAG-2 in decidual CD56 NK cells. *Cell. Immunol.* 183:99–105.

King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. 2000 a. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur. J. Immunol.* 30:1623–1631.

King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D. and Loke, Y.W. 2000 b. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors– a review. *Placenta*. 21:S81–S85.

Koneru, M., Schaer, D., Monu, N., Ayala, A., and Frey, A.B. 2005. Defective Proximal TCR Signaling Inhibits CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocyte Lytic Function *J. Immunol.* 174, 1830–1840.

Kuhn, J.R. and Poenie, M. 2002. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111–121

Kupfer, A., Dennert, G. and Singer, S. J. 1983. Polarization of the Golgi Apparatus and the Microtubule-Organizing Center within Cloned Natural Killer Cells Bound to Their Targets *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7224–7228

Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391:703–7

Lanier, L.L., B. Corliss, J. Wu, and Phillips, J.H. 1998 b. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. 8:693–701.

Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 23 225–274.

Latchman, Y., McKay, P.F. and Reiser, H. 1998. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J. Immunol.* 161:5809–12

Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier L.L. and Phillips, J.H. 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol.* 157:4741–4745.

Le Bouteiller, P., Rodriguez, A. M., Mallet, V., Girr, M., Guillaudeux, T. and Lenfant, F. 1996. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 35(3), 216-25.

Le Bouteiller, P. and Blaschitz, A. 1999. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 167, 233-44.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. and Poirier, F. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19:433–40.

Li, C. and Wong, W.H. 2001. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:31–36.

Lima, M., Teixeira, M.A., Queiros, M.L., Leite, M., Santos, A.H., Justica, B. and Orfao A. 2001. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56lo versus CD56hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol. Dis.* 27:731–743.

Lin, T.M., Halbert, S.P. and Spellacy, W.N. 1974. Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation. *J. Clin. Invest.* 54:576–582.

Ljunggren, H.G. and Karre, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol. Today* 11 237–244.

Logdberg, L. and Wester, L. 2000. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482:284–297

Loke, Y.W. and King, A. 1995. Human implantation: cell biology and immunology. *Cambridge University Press.*

Long, E.O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol*

Lowe, J.B. 2001. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell.* 104:809–812.

Loza, M.J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E. and Perussia, B. 2002. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells, *Blood* 99 1273–1281.

Mager, D.L., McQueen, K.L., Wee, V. and Freeman, J.D. 2001. Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons. *Curr. Biol.* 11: 626–630.

Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Coutifaris, C., Margioris, A.N., Coukos, G., Rice, K.C., Gravanis, A. and Chrousos, G.P. 2001. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol.* (11):1018-24

Mandelboim, O., Pazmany, L., Davis, D.M., Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Rybalov, B. and Strominger, J.L. 1997. Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14666-14670

Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W. and Porgador, A. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409 1055– 1060.

Markel G, Lieberman N, Katz G, Arnon TI, Lotem M, Drize O, Blumberg RS, Bar-Haim E, Mader R, Eisenbach L, Mandelboim O.. 2002. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* 168:2803–10

Masson D, Jarry A, Baurly B, Blanchardie P, Laboisse C, Lustenberger P, Denis MG. 2001. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 49:236–40

Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, Rabinovich GA, Malorni W.. 2005. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding and fission. *J Biol Chem* 280:6969–85.

McCann, F. E., Vanherberghen, B., Eleme, K., Carlin, L.M., Newsam, R.J., Goulding, D. and Davis, D.M. 2003. The Size of the Synaptic Cleft and Distinct Distributions of Filamentous Actin, Ezrin, CD43, and CD45 at Activating and Inhibitory Human NK Cell Immune Synapses *J. Immunol.* 170, 2862–2870

Medewar, P. 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 7, 320-328

Mellor, A.L., Sivakumar, J., Chandler, P., Smith, K., Molina, H., Mao, D. and Munn, D.H. 2001. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol.* (1):64-8.

Moffett-King, A. 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2:656-663.

Moller, M.J., Kammerer, R., Grunert, F. and von Kliest, S. 1996. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural killer cell subpopulation. *Int. J. Cancer* 65:740-45

Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A.M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi M., Ciccone, E. and Moretta, L. 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) Class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities, *J. Exp. Med.* 178 597-604.

Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. and Moretta, L. 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunol. Today* 21, 228-234

Mukhopadhyay D, Sundereshan S, Rao C, Karande AA. 2001 Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J Biol Chem.*;276(30):28268-73.

- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A.L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 281: 1191-3
- Nakajima H, Cella M, Bouchon A, Grierson HL, Lewis J, Duckett CS, Cohen JI, Colonna M.. 2000. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor mediated NK cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 30:3309–18
- Nguyen, J.T., Evans, D.P, Galvan, M., Pace, K.E., Leitenberg, D., Bui, T.N. and L.G. Baum. 2001. CD45 modulates galectin- 1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J. Immunol.* 167:5697–5707.
- Nicoll G, Ni J, Liu D, Klenerman P, Munday J, Dubock S, Mattei MG, Crocker PR. 1999. Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J. Biol. Chem.* 274:34089–95
- Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A. and Vivier, E. 1997. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by Natural Killer cells. *J. Immunol.* 158:5083–86
- Orange, J.S., Rameshm N., Remold-O'Donnellm, E., Sasaharam, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F.A., Rosen, F.S., Geha, R.S. and Strominger, J.L. 2002. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*.99, 11351-11356.

- Orange, J.S., Harris, K.E., Andzelm, M.M., Valter, M.M., Geha, R.S. and Strominger, J.L. 2003. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14151–14156.
- Overton WR. 1988 Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry*. 9(6):619-26
- Pace, K.E., Lee, C., Stewart, P.L. and Baum, L.G. 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163:3801–11.
- Pace, K.E., Hahn, H.P., Pang, M., Nguyen, J.T. and Baum, L.G. 2000. CD7 delivers a proapoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J Immunol* 165:2331–4.
- Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A. 2000. X linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337–46
- Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J. and Baum, L.G. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 378:736–39.

Perillo, N.L., Uittenbogaart, C.H., Nguyen, J.T. and Baum, L.G. 1997. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 97:1851–8.

Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf H. 1996 Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol Reprod.* 55:548-58.

Poirier, F. and Robertson, E.J. 1993. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin *Development* 119 1229–1236

Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L. and M.C. Mingari. 1999. Inhibitory receptors sensing HLAG1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5674–5679.

Popovici RM, Krause MS, Germeyer A, Strowitzki T, von Wolff M. 2005 Galectin-9: a new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:6170-6

Rabinovich, G.A., Modesti, N.M., Castagna, L.F., Landa, C.A., Riera, C.M. and Sotomayor C.E. 1997. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-1, a beta-galactoside-binding lectin. *J Biochem.* 122:365–73.

Rabinovich, G.A., Alonso, C.R., Sotomayor, C.E., Durand, S., Bocco, J.L. and Riera, C.M. 2000.

Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: Activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Diff.* 7:747–53.

Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T. and Iacobelli, S. 2002a.

Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 23:313–320

Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui MC, Kier-Joffe EB, Fainboim

L. 2002 b Induction of allogeneic T -cell hyporesponsiveness by galectin- 1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Diff* 9:661–70.

Rachmilewitz, J., Borovsky, Z., Mishan-Eisenberg, G., Yaniv, E., Riely, G.J. and Tykocinski, M.L.

2002. Focal localization of placental protein 14 toward sites of TCR engagement. *J. Immunol.* 168:2745–2750.

Rachmilewitz J, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R, Tykocinski ML. 2003 Negative regulation of T cell

activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J Biol Chem.*;278(16):14059-65

Radoja, S., Saio, M., Schaer, D., Koneru, M., Vukmanovic, S. and Frey, A.B. 2001. CD8⁺ Tumor-

Infiltrating T Cells Are Deficient in Perforin-Mediated Cytolytic Activity Due to Defective

Microtubule-Organizing Center Mobilization and Lytic Granule Exocytosis *J. Immunol.* 167, 5042–5051

Radaev, S. and Sun, P.D. 2003. Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:93–114

Rajagopalan, S. and Long, E.O. 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 189:1093–1100.

Rajagopalan, S., Fu, J. and Long, E.O. 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J. Immunol.* 167:1877–1881.

Raulet, D.H. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response, *Nat. Immunol.* 5 996–1002.

Redman, C.W.G. and Sargent, I.L. 2003. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review. *Placenta.* 24(Suppl. A):S21–S27.

Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383–84

Robertson, M.J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells, *J. Leukocyte Biol.* 71 173–183.

Rubinstein, N., Ilarregui, J.M., Toscano, M., Rabinovich, G.A. 2004a. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64:1–12.

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA.. 2004b . Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5:241–51.

Salih, H.R., Rammensee, H.G. and Steinle, A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169:4098–102

Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4:573–81.

Slukvin, I.I., Chernyshov, V.P., Merkulova, A.A., Vodyanik, M.A. and Kalinovsky, A.K. 1994. Differential expression of adhesion and homing molecules by human decidual and peripheral blood lymphocytes in early pregnancy. *Cell. Immunol.* 158:29–45.

Snyder, S.K., Wessner, D.H., Wessells, J.L., Waterhouse, R.M., Wahl, L.M., Zimmermann, W., and Dveksler, G.S. 2001. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGFbeta1 by human monocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45:205–216.

Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A. 2004. Functional characterization of DNAM-1(CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int. Immunol.* 16:533–38

Tangye, S.G., Lazetic, S., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., Phillips, J.H. 1999. Cutting Edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 162:6981–85

Than NG, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN, Sumegi B. 2004 Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur J Biochem.* 271:1065-78.

Tomasello, E., Blery, M., Vely, F. and Vivier, E. 2000. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells, *Semin. Immunol.* 12 139–147.

Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., and Parham, P. 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 7:753–763.

van den Brule FA, Price J, Sobel ME, Lambotte R, Castronovo V. 1994 Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates with the invasive phenotype of trophoblastic tissue.. *Biochem Biophys Res Commun.* 201:388-93.

Varla-Leftherioti, M., Spyropoulou-Vlachou, M., Nikou, D., Keramitsoglou, T., Darlamitsou, A., Tsekoura, C., Papadimitropoulos, M., Lepage, V., Balafoutas, C. and Stavropoulos- Giokas, C. 2003. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 49:183–191.

- Verma, S., King, A. and Loke, Y.W. 1997. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 27:979–983.
- Verma, S., Hiby, S.E., Loke, Y.W. and King, A. 2000. Human Decidual Natural Killer Cells Express the Receptor for and Respond to the Cytokine Interleukin 15 *Biol. Reprod.* 62, 959–968.
- Vicovac L, Jankovic M, Cuperlovic M. 1998 Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed.. *Hum Reprod.*13(3):730-5.
- Vogt, A.B., Spindeldreher, S. and Kropshofer, H. 2002. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol. Rev.* 189:136–151.
- Voss, S.D., Daley, J., Ritz, J. and Robertson, M.J.. 1998. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 160:1618–1626.
- Vyas, Y.M., Maniar, H. and Dupont, B. 2002. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol. Rev.* 189, 161–178.
- Walker, J.J. 2000. Pre-eclampsia. *Lancet.* 356:1260–1265.
- Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. 2002. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J. Exp. Med.* 195:277–282.

- Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, Rammensee HG, Steinle A. 2003. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* 33:194–203
- Westgaard, I.H., Berg, S.F., Orstavik, S., Fossum, S. and Dissen, E. 1998. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur. J. Immunol.* 28:1839–1846
- Witt, C.S., Martin, A. and Christiansen, F.T. 2000. Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail. *Tissue Antigens.* 56:248–257.
- Witt, C.S., Whiteway, J.M., Warren, H.S., Barden, A., Rogers, M., Martin, A., Beilin, L. and Christiansen, F.T. 2002. Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia. *Eur. J. Immunol.* 32:18–29.
- Wu, J., Chalupny, N.J., Manley, T.J., Riddell, S.R., Cosman, D. and Spies T. 2003. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J. Immunol.* 170:4196–200
- Wulfing, C., Purtic, B., Klem, J. and Schatzle, J.D. 2003. Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 7767–7772.
- Xu, C., Mao, D., Holers, V.M., Palanca, B., Cheng, A.M. and Molina, H. 2000. A critical role for murine complement regulator *cr1* in fetomaternal tolerance. *Science.* Jan 21;287(5452):498-501.

Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A. and Hemler, M.E. 2002.

Palmitoylation of tetraspanina proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol. Biol. Cell.* 13:767–781.

Yauch, R.L., Kazarov, A.R., Desai, B., Lee, R.T. and Hemler, M.E. 2000. Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J. Biol. Chem.* 275:9230–9238.

Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med.* 188(12):2375-80.

Zhang, X.A., Bontrager, A.L. and Hemler, M.E. 2001. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J. Biol. Chem.* 276:25005–25013.

Zingoni, A., Sornasse, T, Cocks, B.G., Tanaka, Y., Santoni, A. and Lanier, L.L. 2004 Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions, *J. Immunol.* 173 3716–3724.