

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS  
MOLECULARES

**ICOS y su ligando ICOS-L en la  
homeostasis y fisiología de las células NK**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA MONTES CASADO**

MADRID, 2017

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

**ICOS y su ligando ICOS-L en la  
homeostasis y fisiología de las células NK**

**María Montes Casado**

Licenciada en Bioquímica  
por la Universidad Autónoma de Madrid

**Directora: Dra. M<sup>a</sup> Pilar Portolés Pérez**

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III  
CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) y está incluido en los proyectos de investigación financiados por el Instituto de Salud Carlos III: FIS-PI10/00648, FIS-PI13/02153 y AESI- PI16CIII/00012.



**M<sup>a</sup> Pilar Portolés Pérez**, Doctora en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) adscrita al Instituto de Salud Carlos III,

#### **HACE CONSTAR**

Que el presente trabajo titulado “ICOS y su ligando ICOS-L en la homeostasis y fisiología de las células NK” ha sido realizado por **María Montes Casado**, bajo su dirección, en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, como proyecto de tesis doctoral, para optar el grado de doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid 12 de Junio de 2017

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Portolés Pérez

Esta tesis resulta en gran medida de la impagable generosidad de la Dra. Pilar Portolés, que ha permitido que trabajando en su laboratorio logre una meta profesional y personal que ya había relegado a las últimas posiciones en mis objetivos vitales. Todo ha sido posible gracias a ella, a su motivación, confianza, cariño, paciencia y apoyo. Del mismo modo, tengo que dar las gracias al Dr. José María Rojo por sus incontables consejos, correcciones, directrices y apoyos.

Quiero agradecer de manera especial la ayuda, soporte y apoyo recibido de todos mis compañeros de laboratorio: Gloria, Laura y Almudena, y a los que anteriormente estuvieron por aquí, Eduardo y Miriam.

También a todos mis compañeros del Área de Inmunología, de los distintos laboratorios: Inmunobiología (M<sup>a</sup> Luisa, Belén, Maribel, Carolina y Merche); Inmunología de Trasplantes (Jordi y Patricia); Activación Inmunológica (Pilar, Laura, Almudena, Miki); Inmunología Viral (Daniel, Begoña, Manolo, Elena, Barri, Concha y Carmen)... y muchas más personas que han pasado a lo largo del tiempo por el área. Y por supuesto no olvidaré el apoyo prestado por mis compañeros del Servicio de Citometría de Flujo (M<sup>a</sup> Carmen y Mario) y al personal del Animalario (Sheila, Raquel, Pilar y Enrique).

Agradezco al Centro Nacional de Microbiología y al ISCIII todos los medios materiales y de apoyo técnico que me ha facilitado para la realización de esta tesis. Y a todos los amigos que he ido haciendo en todo el campus de Majadahonda, porque cada uno ha contribuido de distinta manera pero siempre de manera positiva a mis días de trabajo aquí.

Gracias al Dr. Manuel Fresno por acceder a ser mi tutor en la Universidad y acompañarme estos años, y a la ayuda de Mada en la gestión.

Gracias a mis padres que tanto se esforzaron para que yo tuviese la mejor formación académica y también personal y que siempre me apoyaron en todo momento. Al resto de mi familia: mis hermanos, mis suegros y mis cuñados, todos han sido cómplices en mayor o menor medida de este gran sueño.

Y por último a Fernando, que sin duda es el pilar fundamental en este proyecto, sin su apoyo logístico en todo momento, moral en los malos momentos, técnico en algunos detalles, y sobre todo sin su paciencia, calma y tranquilidad para ver las cosas de la manera más lógica y racional, no hubiese sido posible. Gracias a tu amor y al de Sofía y Martín, vivir esta vida con vosotros es la experiencia más maravillosa del mundo.

## Índice

1. Resumen.....	11
2. Summary.....	12
3. Introducción.....	15
3.1. Células NK.....	15
3.1.1 Subpoblaciones linfoides innatas. Desarrollo de las células NK.....	16
3.1.2 Función de las células NK.....	20
3.1.3 Señalización intracelular en NK: Importancia de PI3K.....	23
3.1.4 Células NK e infección.....	26
3.2 Células Dendríticas.....	27
3.3 Relación entre las células NK y otras subpoblaciones celulares: “Cross-talk” entre inmunidad innata y adaptativa.....	28
3.3.1 Células NK y células dendríticas.....	29
3.3.2 Células NK y células Treg.....	30
3.4 Moléculas Coestimuladoras.....	31
3.4.1 Moléculas de las familias CD28 y B7.....	31
3.4.2 ICOS.....	34
3.4.3 ICOS LIGANDO.....	36
3.4.4 La interacción ICOS:ICOS-ligando en las respuestas inmunes adaptativa e innata.....	38
4. Objetivos.....	43
5. Materiales y Métodos.....	47
5.1 Animales de experimentación.....	47
5.2 Tampones, medios de cultivo, anticuerpos y otros reactivos.....	47
5.3 Líneas celulares.....	51
5.4 Suspensiones de células primarias.....	53
5.5 Purificación y cultivo de células NK.....	53
5.6 Obtención de células dendríticas derivadas de medula ósea (BMDCs).....	54
5.7 Inmunofluorescencia e inmunquímica.....	54

5.7.1	Tinción de marcadores de superficie y análisis por citometría (FACS).....	54
5.7.2	Separación celular por citometría de flujo ( <i>sorting</i> ).....	55
5.7.3	Tinción intracelular.....	55
5.7.4.	Valoración de apoptosis espontánea. Tinción con Anexina V/ IP.....	56
5.7.5	Valoración de la degranulación celular: Expresión de CD107a (LAMP-1).....	56
5.7.6	Cuantificación de citoquinas por ELISA.....	56
5.8	Ensayos de activación celular y proliferación <i>in vitro</i> .....	57
5.8.1	Ensayos de activación de células NK en placa.....	57
5.8.2	Activación con bolas de latex y preparación de lisados para <i>immunoblot</i> .....	57
5.8.3	Medida de proliferación/viabilidad celular.....	59
5.8.4	Ensayo de inhibidores específicos de PI3 quinasa.....	59
5.8.5	Ensayo de citotoxicidad celular.....	59
5.9	Ensayos <i>in vivo</i> .....	60
5.9.1	Activación con PolyI: C.....	60
5.9.2	Infección con virus <i>vaccinia</i> .....	60
5.10	Genotipado y cuantificación de la expresión génica.....	61
5.10.1	Genotipado de los ratones ICOS-KO.....	61
5.10.2	Obtención ARN y ADNc.....	61
5.10.3	Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR.....	62
5.11	Análisis Estadístico.....	63
6.	Resultados.....	67
6.1	Los ratones ICOS-KO tienen un número reducido de células NK y un incremento de apoptosis espontánea.....	67
6.2	El desarrollo de NK está alterado en ratones ICOS-KO.....	71
6.3	Factores de transcripción implicados en desarrollo NK.....	75
6.4	ICOS se expresa desde los estadios inmaduros de células NK.....	77
6.5	ICOS controla la expresión de ICOS-ligando.....	78
6.6	Análisis de los marcadores fenotípicos de las NK de ratones ICOS-KO.....	83

---

6.7	Análisis funcional de las NKs. Implicaciones de la deficiencia de ICOS .....	85
6.7.1	Distintos estadios madurativos tienen diferente capacidad funcional de producción de citoquinas.....	85
6.7.2	Respuesta funcional de las NK a IL-2.....	86
6.7.3	ICOS e ICOS ligando juegan un papel en la activación de las células NK. ....	89
6.7.4	Interacción entre células NK y células dendríticas.....	93
6.7.5	Efecto de la interacción ICOS:ICOS-L en la función citotóxica de NKs .....	97
6.8	Efecto de la deficiencia de ICOS en la respuesta NK <i>in vivo</i> .....	99
6.8.1	La respuesta NK de ratones ICOS-KO frente a PolyI:C <i>in vivo</i> está disminuida.....	99
6.8.2	La respuesta NK de ratones ICOS-KO frente a la infección viral por vaccinia <i>in vivo</i> está disminuida .....	101
7.	Discusión.....	105
8.	Conclusiones.....	121
9.	Bibliografía .....	125
10.	Anexo.....	139



<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Akt</b>	Proteína Quinasa B
<b>APC</b>	Alofococianina
<b>APC-Cy7</b>	Alofococianina-Cianina7
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno ( <i>Antigen presenting cell</i> )
<b>ARN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BMDC</b>	Célula dendrítica derivada de medula ósea
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CC</b>	Medio Click Completo
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno
<b>CILP</b>	Precursor de ILCs común
<b>CLP</b>	Precursor linfoide común
<b>CTLA-4</b>	Antígeno citotóxico de linfocitos tipo 4
<b>DN</b>	Doble negativa/o
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DP</b>	Doble positiva/o
<b>DC</b>	Célula dendrítica ( <i>Dendritic Cell</i> )
<b>iDC</b>	Célula dendrítica inmadura
<b>pDC</b>	Célula dendrítica plasmacitoide
<b>cDC</b>	Célula dendrítica convencional
<b>mDC</b>	Célula dendrítica madura
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune experimental
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminicotetraacético
<b>ELISA</b>	Enzima-inmunoensayo ( <i>Enzyme- Linked-Immuno-Sorbent-Assay</i> )
<b>Eomes</b>	Eomesodermina
<b>FACS</b>	Separación por Citometría de Flujo ( <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> )
<b>FCSi</b>	Suero de ternera fetal inactivado ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>Foxp3</b>	<i>Forkhead box p3</i>

<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colónias granulo-monocíticas
<b>GVHD</b>	Enfermedad Injerto contra huesped ( <i>Graft versus Host Disease</i> )
<b>hrIL-2</b>	Interleuquina 2recombinante humana
<b>HRP</b>	Peróxidasa de rábano
<b>ICOS</b>	Coestimulador inducible
<b>ICOS-L</b>	Ligando de ICOS
<b>ip</b>	intraperitoneal
<b>MIF</b>	Mediana de Intensidad de fluorescencia
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>ID2</b>	Inhibidor de la unión a ADN tipo 2
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IL2-R</b>	Receptor de IL-2
<b>ILC</b>	Células linfoides innatas
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>IP3</b>	Inositol 3,4,5-trifosfato
<b>ITAM</b>	Motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina
<b>LPS</b>	Lipopolisacarido
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>MCMV</b>	Virus citomegalovirus murino
<b>MFI</b>	Mediana de la Intensidad de fluorescencia (Median Fluorescence Intensity)
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>NMSi</b>	Suero normal de ratón inactivado
<b>NK</b>	Célula Asesina natural ( <i>Natural Killer</i> )
<b>cNK</b>	Célula NK convencional
<b>iNK</b>	Célula NK inmadura
<b>mNK</b>	Célula NK madura
<b>NKP</b>	Precursor células NK
<b>NKT</b>	Célula T <i>natural killer</i>
<b>iNKT</b>	Célula T <i>natural killer</i> invariante
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino

<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy7</b>	Ficoeritrina- Cianina7
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>PH</b>	Homología a Pleckstrina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3 quinasa
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato (éster de forbol)
<b>PolyI:C</b>	Ácido poliinosínico-policitidílico
<b>RT-qPCR</b>	Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones
<b>SB</b>	Tampón para tinción ( <i>Staining Buffer</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Dodecil-sulfato-sódico)
<b>SEM</b>	Error estándar de la media ( <i>Standard error of the mean</i> )
<b>SH2</b>	Dominio de homología a Src tipo 2
<b>SH3</b>	Dominio de homología a Src tipo 3
<b>STAT</b>	Transductor de señales y activador de la transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription)
<b>Strep</b>	Streptavidina
<b>TBP</b>	<i>Tata Binding Protein</i> (Proteína de unión a Tata)
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th1</b>	Célula T cooperadora tipo 1
<b>Th2</b>	Célula T cooperadora tipo 2
<b>Th17</b>	Célula T cooperadora tipo 17
<b>TLR</b>	Receptor tipo <i>Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
<b>WB</b>	Inmunoblot ( <i>Western-blot</i> )
<b>WT</b>	Fenotipo salvaje ( <i>wild type</i> )
<b>ZAP-70</b>	Proteína quinasa de 70 kDa asociada a cadena zeta





Summary  
Resumen

## 1. Resumen

ICOS participa en el desarrollo y la activación de las poblaciones de linfocitos T y NKT; sin embargo, aunque la expresión de ICOS es inducible en NK y participa en sus procesos funcionales, su papel en la biología de los linfocitos NK es aún muy desconocido. Mediante el uso de ratones ICOS-KO, hemos analizado la implicación de ICOS en la homeostasis, maduración y función de las células NK.

En esta Tesis se describe que los ratones ICOS-KO presentan menor proporción y número de células CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> (NK) en la médula ósea y el bazo, y una tasa de apoptosis aumentada en dichas células, sugiriendo un papel de ICOS en la homeostasis de las células NK.

ICOS se expresa en una pequeña fracción de células NK durante el proceso de maduración en la médula ósea, ya desde estadios inmaduros (CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>); su expresión aumenta tras la adquisición del marcador NK1.1 y más aún con distintos estímulos, especialmente en presencia de IL-2.

Los ratones ICOS-KO presentan defectos en el desarrollo de las células NK tanto en médula ósea como en bazo, por lo que la expresión de ICOS se muestra necesaria para el correcto proceso de desarrollo de dichas células. Este desarrollo alterado se traduce en un incremento de células NK en los compartimentos más inmaduros durante el desarrollo de estas células en los ratones ICOS-KO. Estos animales también muestran cambios asociados en la expresión de distintas moléculas efectoras y marcadores funcionales, tales como CD107a (LAMP), Ly49D, KLRG1 o distintas citoquinas efectoras NK, como IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

El déficit de ICOS ha puesto de manifiesto la regulación que ejerce esta molécula sobre la expresión de su ligando (ICOS-L), ya que los animales ICOS-KO presentan una expresión aumentada de ICOS-L. Este aumento se observa tanto en células presentadoras de antígeno (B y DC), donde está bien establecida su expresión, como en células NK. En esta línea hemos encontrado que tanto las NK como las DC son capaces de expresar ambas moléculas, dotando a la vía co-estimuladora ICOS:ICOS-L de una especial relevancia en el fundamental papel que el diálogo NK:DC tiene en la coordinación de las respuestas inmunes innata y adaptativa. La importancia de ICOS e ICOS ligando en la función de las células NK se ha puesto de manifiesto tanto al analizar la capacidad citotóxica de las células, como en ensayos de activación con anticuerpos o construcciones específicas, o en el análisis *in vivo* de la respuesta inmune.

Todos estos resultados revelan una implicación de ICOS:ICOS-L en la homeostasis, desarrollo y función de las células NK de ratón, una de las poblaciones claves en la respuesta inmune, ya que, esta población celular, además de tener un papel indiscutible en el control de infecciones y tumores, puede resultar crucial en el control de otras subpoblaciones linfoides durante la respuesta inmune infecciosa, tumoral y en el control de enfermedades de base inflamatoria.

## 2. Summary

ICOS participates in the development and activation of T and NKT lymphocytes; however, although the expression of ICOS is inducible in NK and participates in its functional processes, its role in NK biology is not fully understood. Using ICOS-KO mice, the role of ICOS in NK cell homeostasis, maturation and function has been analyzed in this Thesis.

Here, we show that ICOS-KO mice have a lower proportion and number of NK cells (CD3-NK1.1<sup>+</sup>) in the bone marrow and the spleen, and an increased rate of apoptosis in these cells, suggesting a possible role of ICOS in NK cell homeostasis.

The expression of ICOS can be detected during the maturation process in the bone marrow, in a small fraction of NK cells from the immature CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> stage. ICOS expression increases after the acquisition of the NK1.1 marker and is further increased in the presence of different stimuli, as IL-2.

ICOS-KO mice show defects in the development of NK cells in both bone marrow and spleen. Thus, ICOS expression is necessary for the proper development of these cells. This altered pattern results in an increase of NK cells in the most immature compartments during the development of these cells in ICOS-KO mice. Associated changes have also been found in the expression of different effector molecules and functional markers such as CD107a (LAMP), Ly49D, KLRG1 or different NK effector cytokines, as IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ .

Lack of ICOS has revealed that it modulates the expression of its own ligand (ICOS-L), since ICOS-KO animals have an increased expression of this marker. Increased ICOS-L expression is observed in antigen presenting cells, such as B cells, where ICOS-L expression is well established, but also in NK cells. In this line we have found that both types of cells, NK and DC, are able to express both molecules, ICOS and ICOS ligand. This fact provides the co-stimulatory pair ICOS:ICOS-L of a particular relevance in the fundamental role of the NK:DC crosstalk in the coordination of innate and adaptive immune responses. The importance of ICOS and ICOS-L binding in the function of NK cells has been demonstrated by analyzing the cytotoxic capacity of cells, as well as in activation assays using antibody or specific fusion proteins, or in the analysis of the immune response *in vivo*.

All these results reveal an implication of ICOS: ICOS-L in the homeostasis, development and function of mouse NK cells, one of the key populations in the immune response, since this cellular population, besides having an indisputable role in the control of infections and tumors, may be crucial in the control of other lymphoid subpopulations during tumor immune response and also in the control of infectious and inflammatory diseases.



# Introducción



### 3. Introducción

#### 3.1. Células NK

Las células NK se identificaron como una población de linfocitos en ratones atímicos (desnudos) capaces de mediar citotoxicidad "natural", sin sensibilización previa, frente a líneas celulares tumorales singénicas y alogénicas (Kiessling et al., 1975a, Kiessling et al., 1975b). Entre sus principales funciones se encuentran la respuesta a patógenos intracelulares como virus, bacterias intracelulares y parásitos, mediar en el rechazo tumoral al distinguir entre células transformadas y células sanas, o participar en las reacciones de rechazo que tienen lugar en trasplantes. Sus funciones están mediadas por su actividad citotóxica y/o la liberación de citoquinas y quimioquinas, que proporcionan un ambiente proinflamatorio y establecen un nexo de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Gabrielli et al., 2016).

Junto con un conjunto heterogéneo de poblaciones de leucocitos, las NK se clasifican como células linfoides innatas (ILCs) porque derivan del progenitor linfoide común (CLP) pero carecen de receptores clonotípicos de antígeno (Ag), y son independientes de los genes RAG (genes activadores de la recombinación) (Geiger and Sun, 2016, Serafini et al., 2015).

A pesar de su inclusión en la inmunidad innata, algunas evidencias han revelado sorprendentes similitudes entre las células NK y las células inmunes adaptativas:

- Las células NK se desarrollan a partir del progenitor linfoide común (CLP), a partir del cual se derivan también las células T y B y el recién descrito linaje de células linfoides innatas (ILCs) (Geiger and Sun, 2016).
- Aunque las células NK no requieren la expresión de la recombinasa RAG para el desarrollo o la generación de su repertorio de receptores, casi un tercio de las células NK periféricas han expresado RAG en algún momento, y esta expresión selectiva da lugar a poblaciones funcionalmente heterogéneas de células efectoras dentro del grupo de células NK periféricas (O'Sullivan and Sun, 2015, O'Sullivan et al., 2015).
- Análogamente a la educación de células T tímicas, las células NK adquieren competencia funcional mediante un proceso de "educación" guiado por el reconocimiento de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (MHC-I). Esta educación determina la eficacia con la que los receptores activadores responden a la estimulación, asegurando la tolerancia de las células NK a los tejidos sanos, al tiempo que permite respuestas robustas a las células alteradas o infectadas. Se ha sugerido que la educación de las NK no se produce sólo durante su

desarrollo en la médula ósea, sino que la función de las células NK periféricas maduras puede adaptarse a los cambios en su entorno, siendo crucial para mejorar las propiedades funcionales y mantener la reactividad de estas células durante la exposición a lo propio, como su estimulación en el contexto de la inflamación.

- Se ha descrito expresión de algunos receptores Ag-específicos en ciertas NK, como por ejemplo el caso de los receptores activadores de la familia Ly49 que participan en el reconocimiento del citomegalovirus (MCMV), proporcionando un mecanismo directo de acción de las NK contra el virus (Pyzik et al., 2011a, Pyzik et al., 2011b).
- Durante el proceso de la infección, las células NK sufren mecanismos de expansión clonal y pueden generar células de memoria a largo plazo (O'Sullivan and Sun, 2015, Gabrielli et al., 2016, Dokun et al., 2001).

De esta forma, las células NK ejercen complejas funciones biológicas que son propias de la inmunidad innata y también de la adaptativa, desdibujando los límites funcionales entre estos dos brazos de la respuesta inmune (Vivier et al., 2011).

### 3.1.1 Subpoblaciones linfoides innatas. Desarrollo de las células NK.

Las células linfoides innatas (ILCs) (Pikovskaya et al., 2016, Serafini et al., 2015) son un grupo de células del sistema inmune innato que pertenecen al linaje linfoide, pero que no responden de una forma Ag-específica, ya que carecen de receptores B y de receptores T (Walker et al., 2013). Este grupo de células, descrito recientemente, posee diferentes funciones fisiológicas, algunas de las cuales resultan análogas a las de los linfocitos T cooperadores, mientras que otras, como las células NK, además presentan función citotóxica. Mediante funciones de citotoxicidad y secreción citoquinas, las ILCs desempeñan un papel muy importante en la inmunidad protectora y en la regulación de la homeostasis y la inflamación. Las ILCs, incluyendo las NK, están distribuidas estratégicamente en diferentes tejidos, sobre todo en superficies de barrera, donde ejercen funciones cruciales durante la infección y la inflamación.

Las ILC se activan de un modo rápido, y tienen mecanismos de control estrictos, ya que su activación excesiva podría contribuir a un daño en el tejido y facilitar procesos inflamatorios. De hecho, los linfocitos innatos han sido recientemente implicados en trastornos inflamatorios incluyendo diabetes, asma alérgica, dermatitis atópica, enfermedades inflamatorias intestinales, fibrosis de órganos y cáncer (Maazi et al., 2015, Paclik et al., 2015). Por otro lado, un defecto en su función podría conducir a la pérdida de la funcionalidad de los mecanismos de barrera, originando patología severa durante una posible infección local (Sojka et al., 2014, Monticelli et al., 2011).

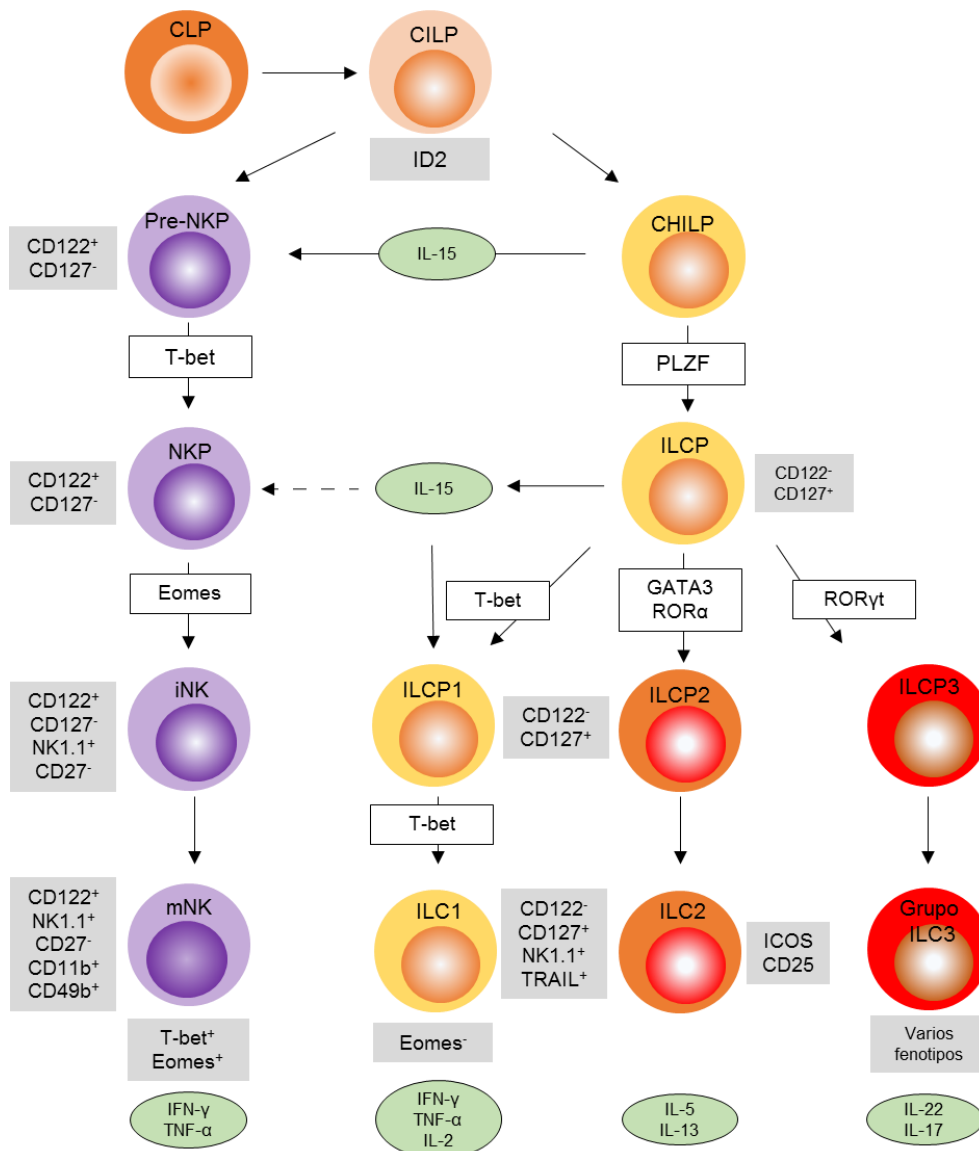
Basándose en la expresión de factores de transcripción y en los perfiles de expresión de citoquinas, pueden distinguirse tres grupos de ILC. Las ILCs del Grupo 1 (ILC1) expresan el factor de transcripción T-bet y

producen la citoquina IFN- $\gamma$ , un potente estimulador de la actividad antimicrobiana de fagocitos mononucleares que controlan las infecciones intracelulares. La diferenciación y el mantenimiento de ILC2 requieren el factor de transcripción GATA-3; esta subpoblación produce gran cantidad de citoquinas de tipo 2 como IL-5 e IL-13 y desempeñan papeles importantes en la inmunidad contra las infecciones por helmintos y en la patogénesis del asma y las alergias. Las ILC3, que expresan ROR $\gamma$ t, son una fuente importante de las citoquinas de tipo 17, IL-22 e IL-17A; son absolutamente necesarias para la defensa contra las infecciones bacterianas intestinales y proporcionan ayuda a las células B de la zona marginal (Geiger and Sun, 2016, Klose et al., 2014, Serafini et al., 2015).

Sin embargo, esta clasificación de ILCs en tres grupos no es estática. El ambiente de citoquinas secretadas por células hematopoyéticas (mieloides y T) y no hematopoyéticas (estromales, endoteliales y epiteliales) es determinante para la regulación de las ILCs. De esta forma, citoquinas como IL-2, IL-7 e IL-15 promueven el mantenimiento y la proliferación de ILCs en los tejidos periféricos; otras señales ambientales como IL-12, IL-18, IL-23 y señales de la microbiota, pueden también modular los perfiles transcripcionales de las ILCs, generando en ellas cierta "plasticidad" funcional, pudiendo existir una transición de ILC3 a ILC1 (Serafini et al., 2015).

Las ILC de tipo 1 constituyen a su vez un grupo de células heterogéneo en cuanto a fenotipo y características, que incluye las llamadas células NK convencionales (cNK). La heterogeneidad de las ILC dificulta mucho la identificación de los estadios de desarrollo de las diferentes subpoblaciones. En la médula ósea se ha definido un progenitor linfoide común (CLP) que da lugar a los precursores de células B, T y células linfoides innatas, incluyendo NK (Geiger and Sun, 2016). El destino hacia cada tipo de linaje está determinado por la participación de una compleja red de factores de transcripción.

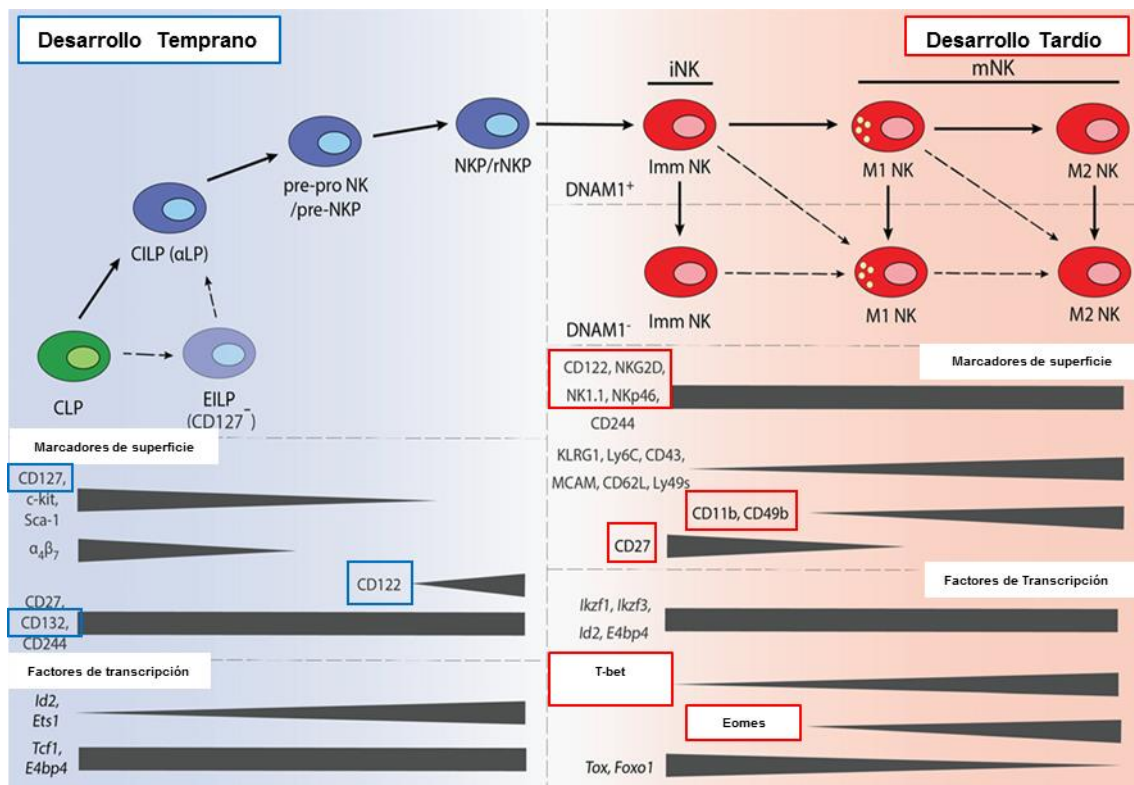
Se plantea la hipótesis de que todas las ILCs se desarrollan a partir de un precursor de ILCs común (CILP) que depende de la expresión del factor ID2 (represor transcripcional de unión al ADN 2) y otros factores transcripcionales para dar lugar a diferentes tipos de precursores, incluyendo el precursor de NK (NKP) o un precursor de ILC "helper-like" (CHILP), cada uno de los cuales generarían una rama diferente de la familia de las ILC (Serafini et al., 2015, Klose et al., 2014) (Figura 1).



**Figura 1. Las células linfoides innatas (ILCs), incluidas las células NK se diferencian de las células madre hematopoyéticas a través de un progenitor linfóide común (CLP).**

Esquema del desarrollo células linfoides innatas, incluidas las células NK. Realizado a partir de (Serafini et al., 2015, Zook and Kee, 2016).

Las relaciones entre estos diferentes precursores siguen siendo poco claras, haciendo que las primeras etapas del desarrollo de las células NK aún no estén completamente esclarecidas. El desarrollo de las células NK convencionales ocurre principalmente en la médula ósea y progresa a través de varias etapas que pueden ser definidas por la expresión de marcadores específicos de superficie celular y factores de transcripción, al mismo tiempo que por la adquisición de competencia funcional (Geiger and Sun, 2016, Serafini et al., 2015).



**Figura 2. Resumen esquemático del patrón de expresión de varios marcadores moleculares a lo largo de las etapas de maduración de células NK en ratón. Modificada a partir de (Goh and Huntington, 2017).**

El primer precursor de células NK (NKP) se define como una célula de médula ósea no estromal que expresa CD122 (la cadena de receptor β común para IL-2 e IL-15) sin ningún marcador específico de linaje (Lin<sup>-</sup>) (Figura 2). Los NKP dan lugar a células NK inmaduras (iNK), que expresan NK1.1 en superficie y el factor transcripcional T-bet y pierden la expresión de CD127 (IL-7Rα). Durante las primeras etapas inmaduras, las células NK humanas o de ratón pueden expresar constitutivamente marcadores funcionales de citotoxicidad y degranulación, incluyendo el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) y CD107a (Lysosomal associated membrane Proteín-1, LAMP), que tienen un papel importante para prevenir el control de tumores y la infección (Takeda et al., 2005, Fu et al., 2011).

A medida que las células iNK avanzan hacia estadios más maduros, comienzan a expresar Nkp46, CD49b (DX5) y el factor de transcripción Eomesodermina (Eomes), entre otros. Aunque todos los ILC1 expresan T-bet, responden a IL-12 e IL-15 y comparten la capacidad de producir IFN-γ, sólo las células NK expresan Eomes, lo que las diferencia de otras ILC1. Las NK maduras también expresan de forma variable receptores de la familia de Ly49, que se unen a las moléculas MHC de clase I propias. La expresión de los receptores inhibidores y activadores determina el proceso de "educación" de las células NK y la adquisición de la

competencia funcional en la citotoxicidad y la producción de IFN- $\gamma$  permitiendo que esas células salgan de la médula ósea como NK maduras (Geiger and Sun, 2016, Cortez and Colonna, 2016).

Después de su salida de la médula ósea, las células NK continúan madurando en la periferia, adquiriendo progresivamente nuevas características fenotípicas y funcionales, incluyendo una mayor expresión de CD11b, KLRG1 y citoquinas, y pérdida de CD27 y TRAIL. La densidad superficial de CD27 y CD11b subdivide las células NK de ratón en cuatro subpoblaciones que definen un modelo de cuatro etapas de maduración NK asociado con una adquisición progresiva de las funciones efectoras de células NK: CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (DN), CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (DP) y CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (Hayakawa et al., 2006, Hayakawa and Smyth, 2006, Chiossone et al., 2009). Las células NK DP circulan dentro del compartimiento linfóide y responden rápidamente a estímulos mediante la secreción de gránulos citolíticos e IFN- $\gamma$ . Estas células pueden madurar adicionalmente hacia células NK CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, que circulan por sangre y tejidos durante más tiempo, pero tienen un mayor umbral de activación y producen menos IFN- $\gamma$ .

Aunque la médula ósea es el principal lugar de desarrollo de las células NK, también se han encontrado células con fenotipo NKP en otros tejidos del ratón, incluyendo timo, bazo, nódulos linfoides e hígado, sugiriendo que los progenitores y las células inmaduras no sólo se localizan en la médula ósea y que la diferenciación de las células NK también podría tener lugar en otros órganos. Recientemente, la heterogeneidad de las ILC del grupo 1 y la coexistencia de distintos grados de maduración en los tejidos está siendo un tema de candente discusión en la literatura. Algunos estudios sugieren que la expresión de Eomes distingue las células NK convencionales Eomes<sup>+</sup> de las células que originalmente se describieron como de fenotipo inmaduro NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>Eomes<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup>TRAIL<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>, que son predominantes en la embriogénesis y en la hematopoyesis neonatal en el hígado, pero que también están presentes en el hígado de ratones adultos. De hecho, se ha demostrado que las células NK TRAIL<sup>+</sup>Eomes<sup>-</sup> del hígado no son precursoras de células NK Eomes<sup>+</sup>. Esto sugiere que las células NK de fenotipo "inmaduro" no son exclusivas de la médula ósea (Gordon et al., 2012, Daussy et al., 2014), y podrían representar linajes de células NK residentes en tejidos, distintas de las células NK convencionales de médula ósea inmaduras o células ILC1 Eomes<sup>-</sup> (Sojka et al., 2014, Cortez and Colonna, 2016, Geiger and Sun, 2016).

El papel de T-bet se ha descrito como determinante en la maduración y funcionalidad de NKs. La ausencia de este factor produce una disminución del número de células NK y un retraso en la maduración, así como defectos en su funcionalidad, produciendo menos IFN- $\gamma$ , perforina y granzima B (Townsend et al., 2004).

### 3.1.2 Función de las células NK

A diferencia de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, las células NK carecen de receptores específicos de Ag aunque, como se ha comentado antes, se han descrito casos de respuesta específica frente a glicoproteínas de algunos virus o determinados haptenos (Dokun et al., 2001, Pyzik et al., 2011a, O'Leary

et al., 2006, Arase et al., 2002). En el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la activación funcional está determinada por la señalización Ag-específica (señal 1), la coestimulación a través de moléculas de superficie (señal 2) y por citoquinas proinflamatorias (señal 3). Sin embargo, en el caso de las células NK, son otros factores, como la interacción receptor–ligando o la señalización a través de citoquinas, los elementos cruciales para su activación, desarrollo, homeostasis y supervivencia (Figura 3). Como veremos más adelante, las moléculas coestimuladoras expresadas en membranas celulares también juegan un papel en la homeostasis, activación y expansión de las células NK, que está aún por estudiar en profundidad.

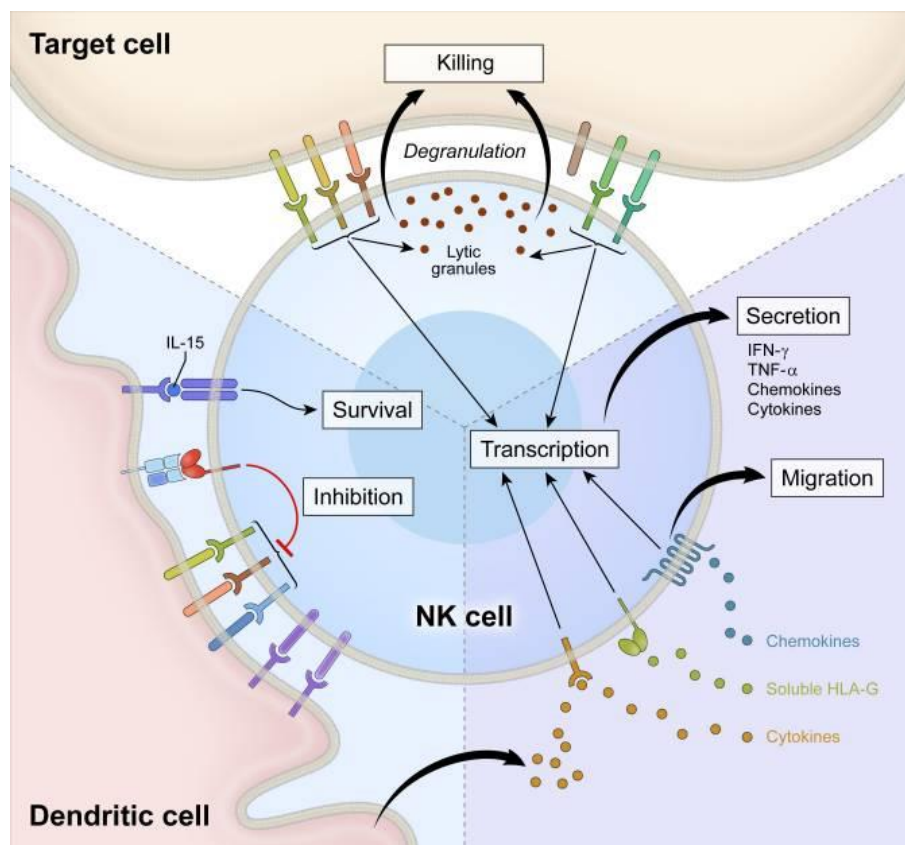


Figura 3. Múltiples señales controlan las distintas respuestas de las células NK. Tomada de (Long et al., 2013)

Las funciones de las células NK se regulan mediante la integración de señales de receptores inhibidores y activadores (Krzewski and Strominger, 2008) que interactúan con moléculas sobre las células diana, y a veces sobre células accesorias, en sitios de contacto especializados conocidos como sinapsis inmunológica (Figura 3).

Los receptores inhibidores se caracterizan por la presencia de motivos citoplasmáticos de inhibición basados en tirosina (ITIMs) y pueden dividirse generalmente en dos grupos:



- Moléculas de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo KIR, LIR, SIGLEC)
- Moléculas de la familia de dominio de lectina de tipo C (por ejemplo NKG2A / CD94).

La interacción de los receptores inhibidores con sus ligandos regula negativamente la actividad de las células NK; la disminución de la expresión del MHC de clase I, debido a la infección viral o la transformación de las células, desbloquearía la inhibición de la señalización de las células NK y podría dar como resultado el inicio de la citotoxicidad y la producción de citoquinas (Lanier, 2001).

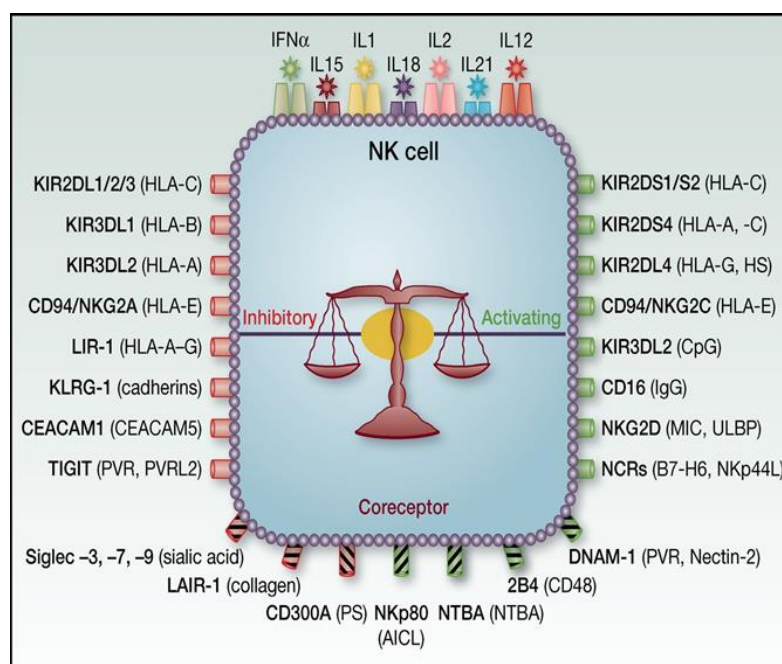


Figura 4. El equilibrio en la integración de señales de receptores inhibidores y activadores regula las funciones de las células NK. Tomada de (Long et al., 2013)

Los receptores activadores también se pueden dividir en dos grupos:

- Receptores asociados a polipéptidos con motivos de activación basado en tirosina (ITAM), incluyendo CD16, NKG2C/CD94 o bien receptores naturales de citotoxicidad (NCR) como NKp30, NKp44 y NKp46.
- Receptores que interactúan con proteínas carentes de ITAM, por ejemplo NKG2D, 2B4 (CD244) o CD2.

La activación de las células NK, mediada por receptores de activación que reconocen sus ligandos expresados en la superficie de las células diana, produce una respuesta compleja y altamente regulada que conduce a los fenómenos de citotoxicidad, incluyendo la liberación o exocitosis de gránulos



conteniendo perforina y granzimas que median la lisis de las células diana y otros tipos de citotoxicidad. Además, estas señales conducen a la secreción de citoquinas, que son determinantes en los fenómenos de expansión de estas células.

Las células NK también son activadas por citoquinas tales como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN- $\alpha$ ; y a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, ya que expresan diversos receptores de tipo Toll (TLRs) (Sivori et al., 2014).

### 3.1.3 Señalización intracelular en NK: Importancia de PI3K

Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), es una familia de enzimas muy conservada en todas las células de mamífero que controla diversos procesos incluyendo proliferación celular, supervivencia, diferenciación, activación de las funciones efectoras y metabolismo (Rojo and Portoles, 2014)

Estas enzimas fosforilan lípidos conteniendo inositol, localizados en la cara interna de la bicapa lipídica de la membrana celular. Esta fosforilación se produce en los grupos OH- en la posición D3 del anillo inositol, generándose fosfatidil inositol-lípidos que sirven de anclaje a enzimas citosólicas, facilitando la interacción con sus sustratos y/o su activación, iniciando diversas cascadas de señalización (Rojo and Portoles, 2014). Esto está mediado por la translocación a membrana de diferentes proteínas efectoras que poseen dominios específicos para inositidos fosforilados (por ej., dominio de homología a pleckstrina, PH). Estas proteínas efectoras están implicadas en múltiples funciones incluyendo supervivencia celular, crecimiento y proliferación. Diferentes señales esenciales para la función de las células inmunes, incluyendo activación por unión de Ag, de moléculas coestimuladoras, o por citoquinas, quimioquinas o ligandos de integrinas incrementan la activación de PI3K. Por ello, estas enzimas son objeto de profundo estudio en estrategias inmunomoduladoras (Rojo and Portoles, 2014).

Las PI3-quinosas constan de una subunidad reguladora y una subunidad catalítica cada una de las cuales presenta a su vez distintas isoformas, y se clasifican en tres grupos definidos por diferencias en la estructura proteica, la regulación de su actividad y la preferencia por el sustrato lipídico: PI3-quinasa de clase I, de clase II y de clase III (Rojo and Portoles, 2014). Las PI3-quinosas de clase I se subdividen en enzimas de clase IA y clase IB. En la Figura 5 se representa esquemáticamente la estructura de las subunidades reguladoras (p85/p55/p50) y la subunidad catalítica de las PI3K de clase IA.

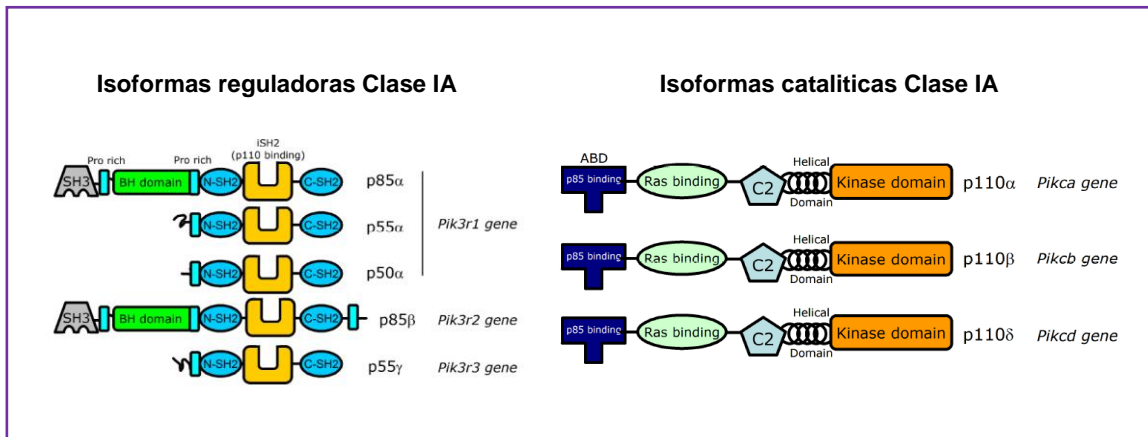


Figura 5. Estructura de las subunidades reguladoras y catalíticas de las PI3k de clase IA. Tomada de (Rojo and Portoles, 2014).

Las PI3K de clase I en los linfocitos se activan a través de diferentes receptores (So and Fruman, 2012) con actividad tirosina-quinasa asociada directa o indirectamente, incluyendo el BCR en linfocitos B, TCR en linfocitos T, receptores de citoquinas y quimioquinas, moléculas coestimuladoras como CD28 o ICOS y proteínas adaptadoras que las reclutan a membrana. En la activación celular se genera fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) que recluta proteínas con dominios de homología a pleckstrina (PH) u otros dominios de unión a PIP3, iniciando distintas cascadas de señalización, como las llevadas a cabo por PDK1, Akt o mTOR (Figura 5).

Se ha señalado a la vía PI3K-Akt-mTOR como esencial para modular el desarrollo, diferenciación y activación de células inmunes incluyendo las células NK. Además, la señalización a través de citoquinas que emplean la vía JAK-STAT también estimula por lo general la vía de señalización de PI3K / Akt (Ali et al., 2015).

En el caso de células NK, los receptores NK-activadores utilizan proteínas transmembrana adaptadoras para transducir señales que conducen a su activación. Por ejemplo, el receptor activador NKG2D se asocia al adaptador DAP10 que recluta la subunidad p85 de PI3K, señaliza a través de la cascada de MAPK y como resultado moviliza los gránulos líticos que contienen perforina y granzima B hacia la célula diana, concluyendo en la lisis de la célula diana (Jiang et al., 2002).

Los estudios iniciales de PI3K en células NK demostraron que PI3K se activa dentro de los 5 minutos de la activación de las células NK y se requiere PI3K para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Otros estudios fueron capaces de demostrar que la expresión de PI3K en células NK es necesaria para la expresión de moléculas implicadas en adhesión celular (LFA-1 e ICAM-1) y por lo tanto es importante para la formación de la sinapsis inmune NK-diana (Gumbleton and Kerr, 2013).

Trabajos publicados independientemente por distintos grupos han demostrado que p110δ es indispensable para la citotoxicidad de células NK (Kerr and Colucci, 2011, Guo et al., 2008); y que la deficiencia o inhibición de PI3K perjudica la maduración de las células NK, la producción de IFN-γ y la citotoxicidad (Sauer et al., 2013).

Akt es un mediador primordial de la señalización de inmunorreceptores a través de PI3K, y promueve la supervivencia celular, la proliferación y el metabolismo (Figura 6). Akt es necesario para la supervivencia de células NK mediada por IL-2 y se activa tras la activación de las células NK. Se ha descrito que la fosfatasa SHIP-1, que es reclutada por los receptores inhibidores de las células NK, suprime la respuesta inmune, incluida la respuesta de estas células al degradar los productos de PI3K inhibiendo esta vía de señalización. Dicha fosfatasa juega un papel importante en el desarrollo, maduración y función de las células NK (Banh et al., 2012).

Del mismo modo se ha visto que el eje de señalización de IL-15-PI3K-mTOR en células NK es importante para su desarrollo, proliferación, capacidad de respuesta a las estimulaciones de citoquinas, y funciones citotóxicas (Ali et al., 2015).

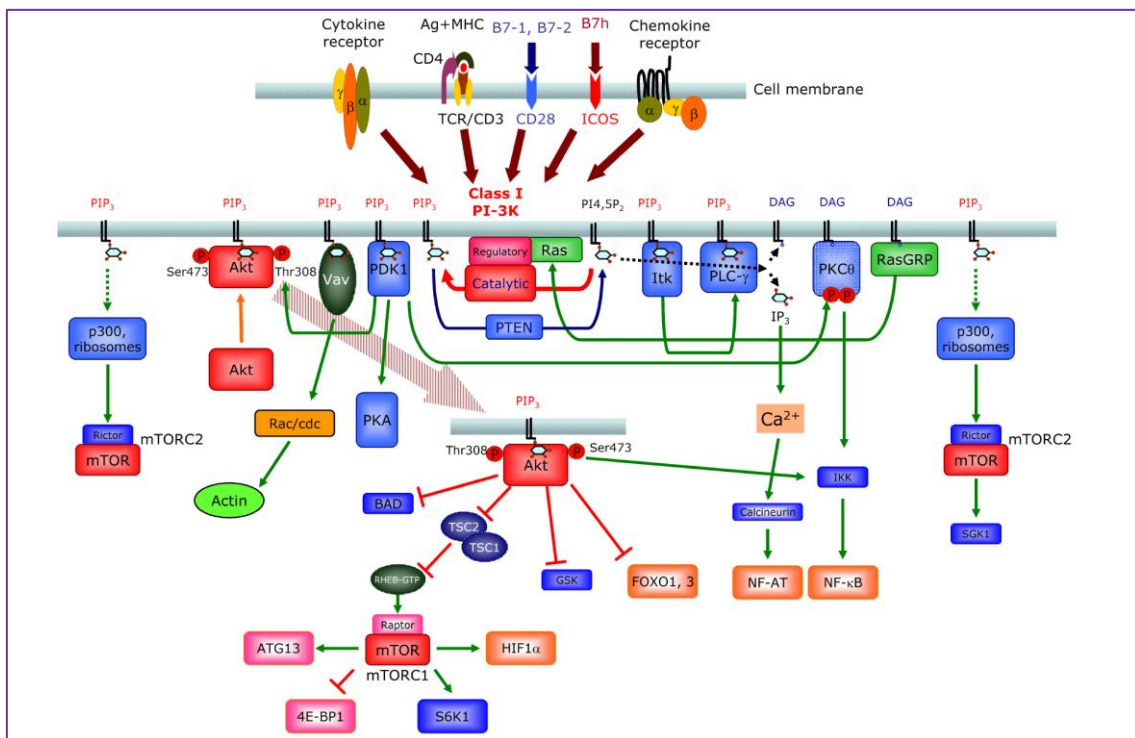


Figura 6. Esquema de la señalización a través de PI3K. Tomada de (Rojo and Portoles, 2014)

### 3.1.4 Células NK e infección

Las células NK participan en la respuesta a patógenos intracelulares, incluyendo virus, bacterias y parásitos, y son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos ya que expresan diversos receptores de tipo Toll (TLRs) (Sivori et al., 2014).

Los TLRs pertenecen al grupo de los “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs) que han sido implicados en el reconocimiento de caracteres conservados en microbios, “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs). Se han identificado ligandos específicos para la mayoría de los TLR. Tanto las NK como otras células inmunes pueden expresar varios tipos de TLRs (Figura 7), originando así una respuesta coordinada ante el mismo patógeno. Los TLRs se expresan en las células NK independientemente de su estado de activación y sus señales pueden ser sinérgicas con señales de quimioquinas o citoquinas. Se han identificado TLR2, TLR3, TLR5, TLR7/8 y TLR9 en células NK (Sivori et al., 2014). Estos reconocen lipoproteína bacteriana, dsRNA producido durante la replicación viral, flagelina bacteriana, ssRNA de virus y motivos CpG del DNA, respectivamente. Algunos agonistas de TLR tienen la capacidad de desencadenar funciones efectoras mediadas por células NK a través de mecanismos indirectos que implican la maduración de DC o monocitos, pero en otros casos, también se ha demostrado un efecto directo (Chalifour et al., 2004, Schmidt et al., 2004).

Las células NK son cruciales en el control innato de las infecciones virales, por ejemplo en el control de las infecciones por poxvirus. Clínicamente se ha descrito que los individuos con funcionalidad alterada de las células NK normalmente sufren infecciones virales graves y recurrentes (Orange, 2002, Lam and Lanier, 2016). El virus *vaccinia* es uno de los miembros más estudiado de la familia poxvirus y fue usado como vacuna viva para la exitosa eliminación del virus de la viruela en los años 70. En respuesta a la infección por *vaccinia* las células NK se activan y migran al sitio de la infección, dirigiendo un efectivo control de la infección (Fortin et al., 2012). Se han encontrado distintas rutas necesarias para la activación efectiva de las NK, que incluyen las rutas dependientes de IFN de tipo I, y del receptor NKG2D, pero aún queda por aclarar cómo está regulada la activación de las células NK por *vaccinia* (Zhu et al., 2007, Martinez et al., 2008, Notario et al., 2016, Fang et al., 2008).

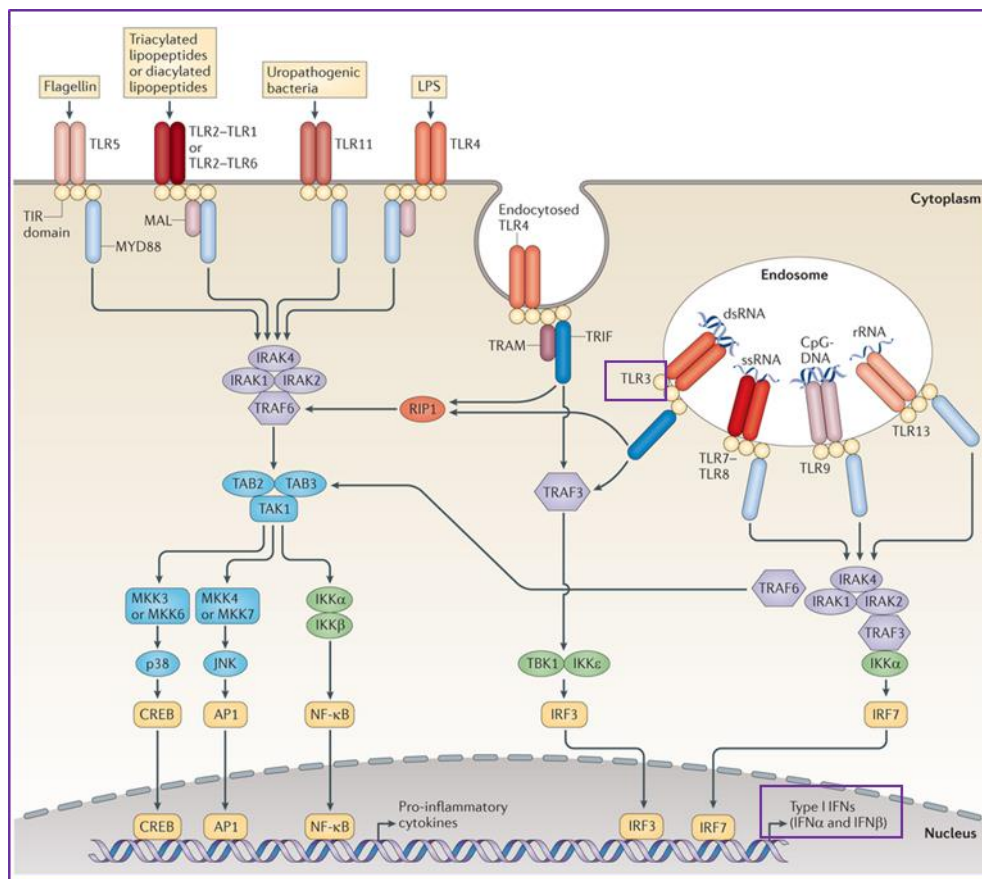


Figura 7. Esquema de la señalización por TLR en mamíferos. Tomado de (O'Neill et al., 2013)

Los interferones de tipo I producidos por las células huésped tras la infección viral representan una pieza clave en la defensa antiviral. Estas citoquinas presentan efectos antivirales directos, pero además median una serie de efectos inmunoreguladores, incluyendo la regulación de la activación de las células NK (Biron, 1999, Biron et al., 1999, Garcia-Sastre and Biron, 2006). Estudios recientes demuestran que la acción de los IFNs de tipo I, producidos por las células dendríticas en respuesta a ligandos sintéticos de TLRs, es necesaria para la activación de las células NK, pero otros sugieren que la acción sobre los TLRs en las NK puede producir activación de un modo directo (Martinez et al., 2008, Lucas et al., 2007).

### 3.2 Células Dendríticas

El sistema inmune innato incluye entre sus componentes mieloides a los fagocitos monocucleares, un complejo grupo de células mieloides que abarca tres tipos de células principales, monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC), junto con sus progenitores proximales. Estos tres tipos de células contribuyen a mantener la integridad del huésped determinando la defensa inmune tanto innata (por ej. función genérica relacionada con sus propiedades fagocíticas) como adaptativa (por ej. capacidad para presentar Ag a las células T). Los monocitos patrullan el organismo para la detección de patógenos y presentan

predominantemente respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo. Los macrófagos realizan principalmente funciones microbicidas, de barrido y mantenimiento de tejidos (Reynolds and Haniffa, 2015).

Las DC se definieron inicialmente por su morfología dendrítica y su capacidad de capturar, procesar y presentar Ags de forma óptima a linfocitos T, y generar respuestas inmunes específicas. Posteriormente se ha comprobado que también son capaces de activar otros tipos celulares, como linfocitos B, células NK, macrófagos o eosinófilos, e incluso generar tolerancia inmunológica. Incluyen dos tipos de células principales, las plasmacitoides (pDC), que son expertas en la síntesis de interferón tipo I tras la estimulación viral, y las convencionales (cDC), que se especializan en la captura, procesamiento y presentación de Ags para la activación de células T (Vu Manh et al., 2015).

Las DCs inmaduras (iDC) son muy eficientes en la captura de Ags y en la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias; se localizan en órganos linfoides periféricos y en superficies mucosas, donde están en continuo contacto con Ags (Chang et al., 2014, Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Poseen receptores capaces de reconocer determinados componentes de los patógenos, incluyendo casi todos los TLRs descritos (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10).

La estimulación a través de los TLR produce la maduración de las DCs y su migración a nódulos linfáticos, convirtiéndose en células dendríticas maduras (mDC) capaces de estimular eficientemente células T gracias a su capacidad de presentar Ags (aumento en la expresión de moléculas MHC) y su capacidad coestimuladora (con la expresión de moléculas como CD40, CD80 y CD86) (Steinman et al., 2003a, Steinman et al., 2003b). Las DCs pueden generar respuesta Th1 o Th2 dependiendo del ambiente que les rodee o de los estímulos que reciban (Motta and Rumjanek, 2016, Na et al., 2016).

Los últimos avances en el conocimiento de las DCs han permitido el desarrollo de ensayos clínicos basados en el uso de estas células en el campo de la inmunoterapia antitumoral y antiinfecciosa o para inducir tolerancia postrasplante o en patologías autoinmunes (Audiger et al., 2017).

### **3.3 Relación entre las células NK y otras subpoblaciones celulares: “Cross-talk” entre inmunidad innata y adaptativa.**

Ciertos patógenos, como el citomegalovirus de ratón, son reconocidos de forma Ag-específica por receptores de células NK; sin embargo, en la mayoría de los casos la activación de células NK se produce de forma indirecta mediante las señales proporcionadas por células accesorias. Por ejemplo, se ha visto que las células NK de sangre periférica, bazo o ganglios linfáticos pueden responder a ciertos patógenos, mientras que las células NK purificadas o las líneas de células NK no son capaces de hacerlo solas (Newman and Riley, 2007, Thomas and Yang, 2016). Otra evidencia de la importancia de las células accesorias proviene del gran número de estudios que usan anticuerpos bloqueantes o ratones *knockout*

para mostrar la importancia de las citoquinas derivadas de células accesorias en la respuestas de las células NK.

### 3.3.1 Células NK y células dendríticas

En los últimos años, se ha investigado ampliamente sobre las interacciones relevantes que ocurren entre las células NK y las células de los linajes monocito/ macrófago/ DC. Se ha demostrado que durante las etapas tempranas de activación de la respuesta inmune existe una interacción crítica entre las células NK y las DC, que permite el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. El dialogo bidireccional entre las DC y las células NK puede ocurrir en la periferia o en tejidos linfoides secundarios, en los focos de infección y en nódulos linfáticos, donde interactúan mediante contactos célula-célula y factores solubles. Este “cross-talk” NK-DC produce maduración, activación y secreción de citoquinas por parte de ambas células (Thomas and Yang, 2016).

Las DC inducen proliferación y activación de células NK mediante la producción de citoquinas, entre las que destacan IL-12, IL-18, IL-15, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Las células mieloides, también pueden suprimir y modular la respuesta excesiva de las NK evitando una reacción inflamatoria peligrosa. Es el caso del modelo de infección por virus *vaccinia* en ratón (Fortin et al., 2012), en el que la respuesta de NK está regulada por células supresoras derivadas de serie mieloide (MDSCs) que controlan la activación excesiva de las NK a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta supresión mediada por MDSCs evita los efectos deletéreos de una respuesta inflamatoria excesiva que pondría en riesgo la vida del animal.

También se ha descrito que la expresión estable de Qa1, ligando de NKG2A, en la superficie de DC maduras contribuye a la protección de dichas células de la lisis mediada por células NK y a (Persson CM, 2008). En otros casos, las células dendríticas activadas con IFN- $\alpha$  activan a las células NK mediante la expresión de moléculas A y B relacionadas con MHC-I (MICA/B), que son ligandos del receptor activador NKG2D (Jinushi et al., 2003).

Recíprocamente las células NK, pueden regular la función y número de células dendríticas. A través de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  las NKs maduran las células dendríticas (Piccioli et al., 2002, Gerosa et al., 2002). Los niveles de DCs inmaduras están reguladas por la actividad citolítica de las células NK, ya que las iDCs pueden ser lisadas por células NK autólogas y alogénicas, mediante el previo reconocimiento entre células efectoras y dianas, en el que actúa la unión entre CD40 (en células dendríticas) y CD40L (en células NK). Las células dendríticas maduras, sin embargo, son resistentes a la actividad citolítica de células NK. Esta regulación de los niveles de células dendríticas inmaduras por las células NK, se postula como un mecanismo de control de la activación de inmunidad adaptativa, permitiendo sólo a las dendríticas maduras actuar en la presentación antigénica (Moretta et al., 2003a, Moretta et al., 2003b).



### 3.3.2 Células NK y células Treg

Las células T reguladoras (Treg) ejercen efectos supresores sobre una gran variedad de subpoblaciones celulares como linfocitos T CD4, T CD8, células NKT, células B, DC, monocitos, macrófagos y también NKs (Zimmer et al., 2008). Con este efecto las células Treg FOXP3<sup>+</sup> mantienen la tolerancia inmunológica suprimiendo la capacidad de respuesta de otras poblaciones incluyendo la de las células NK.

Distintos estudios describen los mecanismos mediante los cuales las células Treg regulan las células NK (Gasteiger et al., 2013b, Pedroza-Pacheco et al., 2013). Se ha descrito que la presencia de Treg naturales FoxP3<sup>+</sup> inhibe la actividad citotóxica y de producción de citoquinas de las células NK; la depleción de Treg puede generar unas NK “hiperactivadas” que producen gran cantidad de IFN- $\gamma$ . Otros estudios sugieren que las Treg limitan la cantidad de IL2 procedente de los linfocitos T, compitiendo por este factor de supervivencia y crecimiento con las células NK y afectando de esta forma a dicha subpoblación. Incluso, las nTreg podrían inhibir el proceso de maduración de las NK a partir de su precursor en nódulos linfáticos (Leavy, 2013, Giroux et al., 2007).

Recíprocamente también se ha visto que las células NK ejercen efectos moduladores sobre las células Treg, ya que el IFN- $\gamma$  producido por las NK inhibe la conversión de linfocitos T en Treg.

El papel que ejercen las células Treg sobre las células NK tanto directa como indirectamente a través de la supresión de las células dendríticas, la secreción de mediadores solubles inhibidores o la limitación de factores de supervivencia/activación para las NK, coloca a esta subpoblación en la intersección de la inmunidad innata y adaptativa (Gasteiger et al., 2013a). La interacción entre estos dos tipos de células ha sido indicada como beneficiosa en determinadas condiciones fisiológicas, como el embarazo; mientras que en el caso de ciertas patologías, tales como enfermedades autoinmunes y cáncer, esta interacción puede llegar a ser perjudicial, ya que las células Treg suprimirían las células NK y en particular su función efectora (Pedroza-Pacheco et al., 2013).

En conjunto se comprueba que las células NK interactúan con múltiples poblaciones celulares (Figura 8), incluyendo DC, Treg y macrófagos entre otras, ejerciendo sobre ellas funciones moduladoras e incluso en algunos casos supresoras, surgiendo de todo esto el interesante concepto de células NK “reguladoras”, como una subpoblación de células NK que suprimiría la acción de otras células inmunes del mismo modo que lo hacen las células Treg (Zhang et al., 2006, Zhang and Tian, 2017).



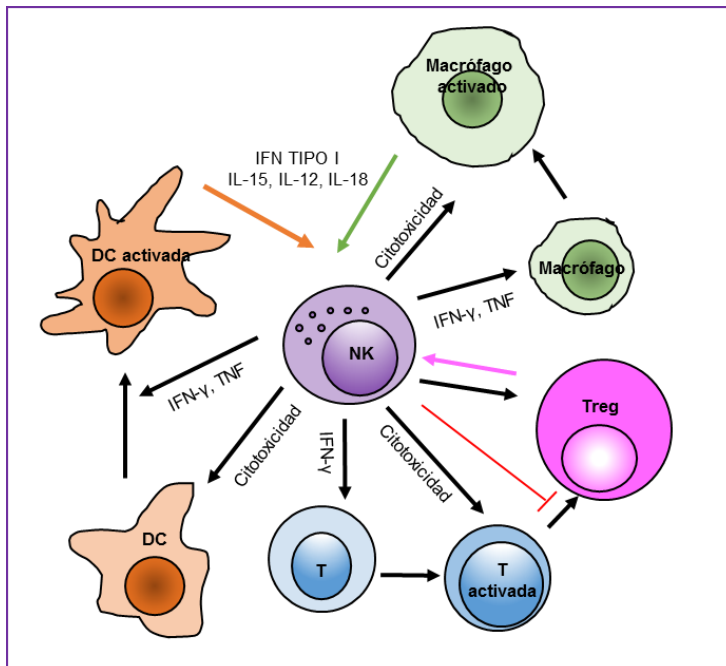


Figura 8. Inter-relación entre las células NK y otras subpoblaciones celulares, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa.

### 3.4 Moléculas Coestimuladoras

En la inmunidad adaptativa, la activación óptima de los linfocitos T *naïve* requiere un reconocimiento específico del Ag por parte de los linfocitos (señal 1), señales adicionales coestimuladoras (señal 2) y citoquinas (señal 3). En ausencia de la señal 2, los linfocitos no responden eficazmente y se hacen anérgicos. La señal 1 es proporcionada por la interacción del receptor de células T (TCR) con complejos MHC de clase I o clase II que presentan un péptido antigénico específico. La señal 2 es proporcionada a las células T mediante moléculas de superficie coestimuladoras que se expresan sobre las células T y que normalmente encuentran sus ligandos en las células presentadoras de Ag (APC). La expresión de ligandos coestimuladores es dependiente de estímulos que están regulados por la inmunidad innata (Medzhitov and Janeway, 1997). La coestimulación resulta de interés terapéutico ya que la manipulación de las señales coestimuladoras puede proporcionar un medio para mejorar o limitar las respuestas inmunes (Sharpe and Freeman, 2002).

#### 3.4.1 Moléculas de las familias CD28 y B7

**La familia de CD28** es la familia de coestimuladores de células T mejor caracterizada y es crucial para la activación de estas células, la prevención de la tolerancia y para dar lugar a una óptima respuesta inmune mediada por linfocitos T. Estas moléculas de co-señalización no sólo aportan señales positivas que promueven el crecimiento, la producción de citoquinas y la diferenciación de las células T, sino que también contribuyen con señales negativas que limitan, terminan y/o atenúan la respuesta de estos linfocitos.

Son miembros de esta familia: CD28, CTLA-4 (CD152), ICOS, PD-1, BTLA y TLT-2.

CD28 se expresa en células T naive y en activadas y es requerido para la producción óptima de citoquinas y la proliferación. La unión de CD28 a sus ligandos o a anticuerpos desempeña un papel crítico en la proliferación y supervivencia celular tras la activación de células T. En general, las respuestas primarias mediadas por células T son más dependientes de CD28 que las respuestas secundarias.

La expresión de ICOS y CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) está restringida a células T activadas y de memoria. ICOS también se expresa en NK activadas y en muy bajos niveles en NK en reposo. Mientras que ICOS regula la producción de IL-4 y la formación de centros germinales, CTLA-4 es un potente regulador negativo de la respuesta de células T, inhibiendo la proliferación activada por TCR y CD28 (Rudd and Schneider, 2003). CD28 y CTLA-4 juegan también un importante papel en la activación de células NK; CD28 se expresa constitutivamente y CTLA-4 se induce tras la activación de la célula NK (Stojanovic et al., 2014). PD-1 (Programmed Death), BTLA, TLT-2 y el receptor de B7h4 son otros miembros de la familia de CD28 que median inmunosupresión.

Por su estructura, estos coestimuladores se integran en la super-familia de las Igs. CD28, CTLA-4 e ICOS forman homodímeros en los que cada cadena contiene una porción extracelular con estructura de dominio variable de Ig, mediante el que se unen a su correspondiente ligando expresado sobre APCs. PD-1, BTLA-4 y TLT-2 no presentan el puente disulfuro que contribuye al mantenimiento de los dímeros que sí poseen CD28, CTLA-4 e ICOS, pero por analogía estructural y por la naturaleza de sus ligandos (pertenecen a la familia B7) son incluidos también en la familia de CD28 (Rojo et al., 2001). Sus colas citoplásmicas contienen sitios putativos de unión a dominios SH2 y SH3, a través de los cuales se implican en señalización y transducción de señales, como luego comentaremos. A pesar de su similitud estructural presentan diferencias entre sí en cuanto a su expresión, constitutiva o inducida, ligandos y funciones.

La estructura molecular de los miembros de la familia de CD28 y de sus ligandos, su expresión y efecto se esquematizan en la Figura 9.

**La familia B7** es una de las familias más importantes implicadas en mecanismos de señalización secundaria y es esencial para mantener el delicado equilibrio entre la potencia inmune y la supresión de la autoinmunidad (Greaves and Gribben, 2013). El primer miembro descrito de esta familia fue una molécula descubierta en linfocitos B esplénicos, activados y proliferativos y se le llamó B7 como marcador de células B. B7 (CD80, B7-1) se une y activa CD28 y también CTLA-4.

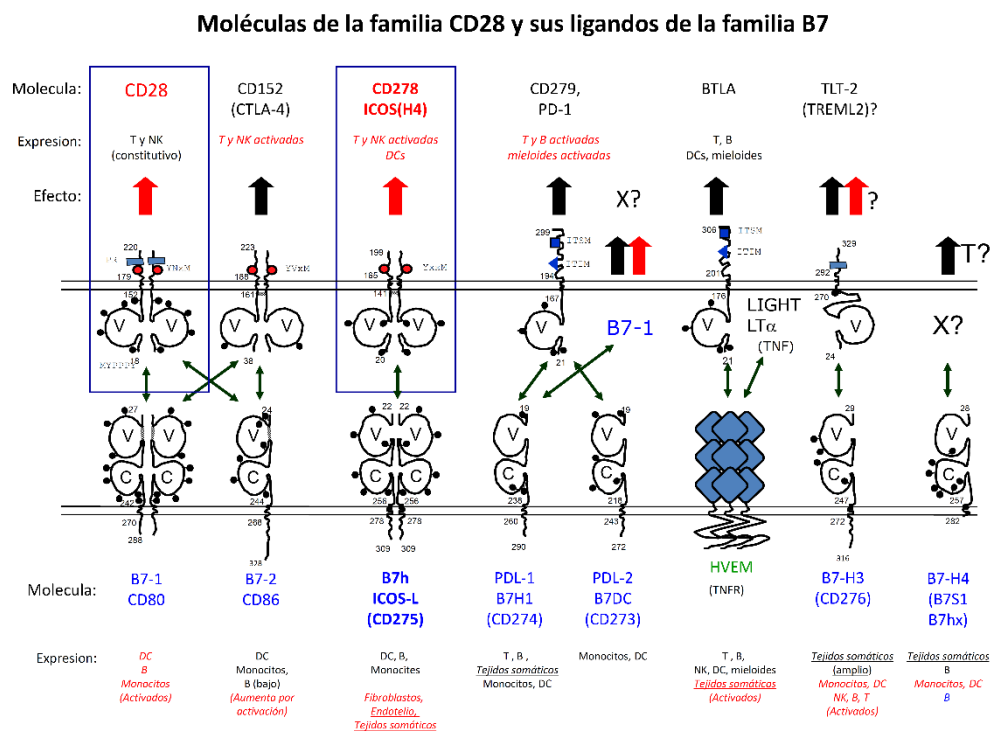


Figura 9. Esquema de la estructura de los miembros de las familias CD28 y B7, distribución celular y efecto funcional (cedido por J.M. Rojo). Flecha roja indica activación, flecha negra inhibición.

Los componentes de la familia B7 son también glicoproteínas transmembrana de tipo I y miembros de la superfamilia de las Ig. A pesar de que los miembros de esta familia sólo comparten un 20-35% de identidad en su secuencia de aminoácidos, tienen una estructura secundaria muy similar consistente en dos dominios extracelulares de tipo Ig, uno variable (V) y el otro constante (C) (Figura. 9). Además tienen 4 cisteínas muy conservadas, que son las responsables de la formación de los puentes disulfuro de los dominios Ig. (Greaves and Gribben, 2013, Wang and Chen, 2004b, Wang and Chen, 2004a).

Los primeros miembros identificados de esta familia (Tabla 1) fueron las moléculas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), pero se han ido añadiendo nuevos miembros secuencialmente como CD275 (ICOS-ligando, B7RP-1/B7h, B7-H2), CD274 (B7-H1/PD-L1), CD273 (B7-DC /PD-L2), CD276 con varios homólogos como B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (ligando de NKP30, molécula expresada en células NK) y CD277 (BT3.1, BTF5) (Greaves and Gribben, 2013).

CD	Molécula	Designación B7	Otras designaciones	Principales ligandos
CD80	B7-1	B7-1	B7	CD28, CD152 (CTLA-4)
CD86	B7-2	B7-2	-	CD28, CD152 (CTLA-4)
CD274	Ligando muerte celular programada 1	B7-H1	PD-L1	CD279 (PD-1)
CD275	Ligando de ICOS	BN7-H2	B7RP-1, B7h, ICOS-L	CD278 (ICOS)
CD276	Homóloga de B7 3,4 y 6	B7-H3,4,6	B7S1,B7x	¿? TLT-2, BTLA, NKp30
CD273	Ligando muerte celular programada 2	B7-DC	PD-L2	CD279
CD277	Butirofinina SF3	-	BT3.1. BTF5	¿?

**Tabla 1. Nomenclatura de las moléculas de la familia B7. A partir de (Greaves and Gribben, 2013)**

CD80 ha sido implicado en terapia antitumoral tras la observación de que las células T citotóxicas erradican mejor tumores malignos murinos cuando estos han sido transfectados con CD80 y CD86 (Greaves and Gribben, 2013). A partir de esos hallazgos se han valorado múltiples aplicaciones terapéuticas potenciales asociadas a la actividad de B7, como su uso como coadyuvantes estimuladores inmunes a la terapia anticancerígena convencional, trasplante de células madre hematopoyéticas, vacunas antitumorales, así como atenuación de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

### 3.4.2 ICOS

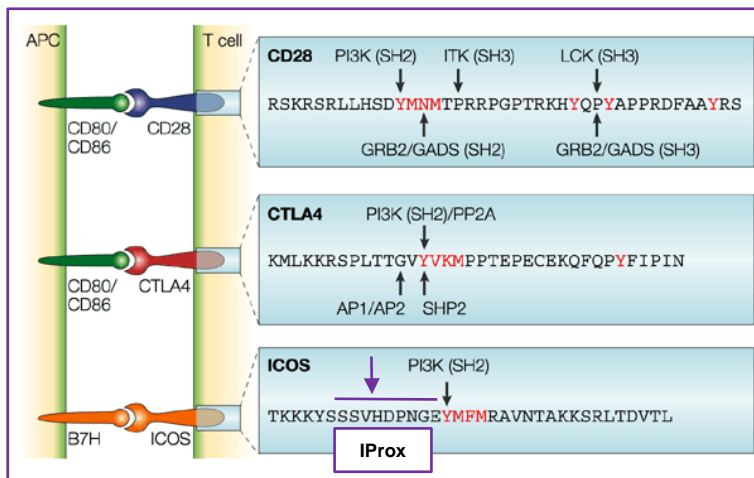
Como hemos comentado anteriormente, ICOS (Inducible Costimulator, CD278) es una molécula coestimuladora perteneciente a la familia de CD28, con la que presenta cierta homología. ICOS no se expresa constitutivamente en células T en reposo, sino que es inducido rápidamente después de la activación vía TCR y/o la coestimulación de CD28 y también células NK activadas. Sin embargo, ICOS está constitutivamente expresado en una pequeña subpoblación de células T CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> que muestra funciones reguladoras, y también en células NKT (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). Recientemente, se ha descrito la expresión conjunta de ICOS y su ligando en células dendríticas (Hedl et al., 2014) y en células ILC2 (Maazi et al., 2015, Paclik et al., 2015). Esta expresión conjunta permitiría interacciones homotípicas del par receptor-ligando, señalización intracelular y tendría consecuencias en patologías como veremos más adelante.

La estructura de ICOS es similar a la de otros miembros de la familia de CD28 (Figura 9): Presenta un 19% de identidad con CD28; es una glicoproteína homodimérica de 50-65 KDa, formada por dos cadenas

polipeptídicas de 25 y 29 KDa unidas por puentes disulfuro, que sólo difieren en sus modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones). Sin embargo, existe un porcentaje variable de ICOS que se expresa en forma de monómero (Redoglia et al., 1996, Hutloff et al., 1999, Yoshinaga et al., 1999). Consta de un péptido señal de 20 aminoácidos, un dominio tipo Ig variable (V) (residuos 21-132) en el que se encuentran 4 cisteínas conservadas implicadas en la formación de puentes disulfuro intra-moleculares, un pequeño péptido conector que incluye la cisteína 137 implicada en la formación de puentes disulfuro inter-moleculares, un dominio transmembrana (residuos 141-164) y un dominio citoplásmico de 35 aminoácidos (Rudd and Schneider, 2003, Rudd et al., 2009).

A diferencia de CD28 y CTLA-4, ICOS carece del motivo MYPPPY responsable de la unión a CD80 y CD86 (Figura 10) y parece jugar un papel no redundante en la modulación de la activación de las células T (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). ICOS carece también del motivo PxxP en el dominio citoplásmico, responsable de la unión a CD28 de varias proteínas con dominios SH3 como Grb-2 o Lck (Yoshinaga et al., 1999, Rudd and Schneider, 2003, Prasad et al., 1994, Hutloff et al., 1999, Peach et al., 1994, Coyle et al., 2000) (Figura 10). Sin embargo, al igual que CD28 y CTLA-4, ICOS sí que presenta el motivo YxxM de unión al dominio SH2 de distintas subunidades de PI3K. Una vez fosforilado, el motivo YxxM de ICOS es capaz de asociar las subunidades reguladoras p85 y p50 de PI3K, y a través de ellas a las subunidades catalíticas p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$  (Gumbleton and Kerr, 2013, Kerr and Colucci, 2011) y a osteopontina intracelular (Leavenworth et al., 2015b). En comparación con CD28, ICOS activa predominantemente la vía de PI3K y de producción de PIP3 que induce fosforilación de Akt/PKB (Proteína quinasa B) más fuerte de lo que hace CD28; sin embargo, CD28 induce una señalización más intensa a través de JNKs (quinasas c-Jun N-terminal) (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). Es decir, ciertas señales de ICOS y CD28 no parecen ser redundantes y además, teniendo en cuenta el efecto sobre Akt, ICOS podría estar implicado en la prevención de la apoptosis. Recientemente se ha descrito en el dominio citoplásmico de ICOS un nuevo motivo de señalización denominado *lprox*, que reconoce a la quinasa de serina y treonina denominada TBK1, de gran importancia en el desarrollo de células T foliculares (Tfh) en centros germinales (Pedros et al., 2016) (Figura 10).

El estudio de ICOS en modelos animales deficientes en ICOS o en su ligando ICOS-L revela que esta molécula coestimuladora juega un papel fundamental en el desarrollo, en número y tamaño, de los centros germinales en el bazo y en el cambio de clase de los Abs frente a Ag-T-dependientes, como veremos más adelante.



**Figura 10.** Dominios citoplasmáticos de las moléculas CD28, CTLA-4 e ICOS, con los distintos motivos de unión a varias proteínas implicadas en señalización celular. Tomada de (Rudd and Schneider, 2003) con modificaciones de (Pedros et al., 2016).

### 3.4.3 ICOS LIGANDO

El ligando de ICOS (ICOS-L, también conocido como B7h, B7-H2, B7RP-1, LICOS, GL50 y CD275) es un homólogo de B7. ICOS-L tiene una estructura similar a la de otros miembros de la familia B7 (Figura 9), sin embargo, ICOS-L no se une a otros miembros de la familia CD28 distintos de ICOS, salvo en humanos, donde presenta una baja afinidad por CD28 y CTLA-4 (Yao et al., 2011).

ICOS-L y los ligandos de CD28 (CD80 y CD86) presentan aproximadamente un 20% de homología entre ellos. Esta identidad en la secuencia incluye la conservación de residuos de cisteína (residuos 62, 138, 185 y 242) y otros residuos clave para el mantenimiento de la estructura tipo dominio Ig (Yoshinaga et al., 1999).

ICOS-L se expresa constitutivamente en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células B, macrófagos y células dendríticas. Además, en respuesta a señales inflamatorias, la expresión de ICOS-L también puede inducirse en células de origen no hematopoyético, tales como células endoteliales vasculares, células epiteliales y fibroblastos, y en células tumorales de diversos tipos.

La principal función conocida de ICOS-L es la activación de ICOS, y se ha visto que su expresión está sujeta a regulación en procesos inflamatorios (Swallow et al., 1999, Wang et al., 2000). Se ha propuesto que la vía de coestimulación por ICOS está regulada por retroalimentación negativa, de modo que existe una disminución en la expresión de ICOS-L en respuesta al incremento de la expresión de ICOS (Watanabe et al., 2008). También, la expresión de ICOS-L en células dendríticas puede ser regulada negativamente por IL-10, y la expresión de ICOS-L de DC en presencia o ausencia de coestimulación de IL-10 puede promover la respuesta de Treg o Th17, respectivamente, sin impacto significativo en Th1 (Gao et al., 2013). La interacción ICOS:ICOS-L facilita la formación de células T foliculares a través de la inducción del factor de transcripción Bcl6 en la célula T, y es crítica para la formación del centro germinal. Además, puede

promover la producción de varias citoquinas por células T, incluyendo IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, e IFN- $\gamma$ . También puede influir en la función de las células T tanto efectoras como reguladoras, lo que puede dar lugar a resultados a primera vista contradictorios, dependiendo del tipo de célula que domine el efecto. Por ejemplo, en los ratones deficientes en ICOS se exagera la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Dong et al., 2001), pero también estos animales son menos susceptibles a la artritis inducida por colágeno (CIA) (Nurieva et al., 2003). En el caso de EAE, el aumento en los síntomas de ratones ICOS-KO puede deberse al aumento de respuestas Th1 y Th17 junto con déficit de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (Rojo et al., 2008); mientras que la ausencia de ICOS dificultaría la formación de centros germinales y producción de Abs inductores de artritis en el modelo animal de CIA (Nurieva et al., 2003). Estos hallazgos hacen difícil predecir cuál sería el resultado de las estrategias dirigidas a esta vía.

Tanto las células dendríticas convencionales, también denominadas mieloides (cDCs), como las plasmacitoides (pDCs), expresan diferentes tipos de conjuntos de moléculas para la activación de células T, incluyendo CD80, CD86 e ICOS-L. Las células cDCs inmaduras expresan ICOS-L, pero sus niveles disminuyen al madurar.

ICOS-L proporciona a las pDCs maduras la capacidad de inducir la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> que producen IL-10 pero no IL-4, IL-5, e IL-13, convirtiéndolas en células T reguladoras (Ito et al., 2007). La expresión de ICOS-L en DCs es importante para el mantenimiento de la homeostasis inmune, ya que la señalización ICOS:ICOS-L es esencial para que las DC tolerogénicas productoras de IL-10 induzcan la anergia de las células T (Gao et al., 2013).

Además de los efectos promovidos por la interacción ICOS:ICOS-L sobre células T y otras células linfoides, como NK, recientemente se ha descrito la estimulación de “señales reversas” producidas por la interacción ICOS:ICOS-L sobre la célula portadora de ICOS-L. De esta forma, la estimulación de ICOS-L expresado sobre DCs induce p38-MAPK que produce un aumento de la expresión de IL6, aumenta la fagocitosis y la función presentadora de Ag en las DCs *in vitro* y favorece la inmunidad celular *in vivo* (Tang et al., 2009). Además, las señales mediadas por ICOS-L inhiben la adhesión de DCs inmaduras y maduras a células endoteliales vasculares y linfoides, su actividad migratoria y motilidad, sugiriendo que la estimulación de ICOS-L modula la función de DC y puede tener efectos en su maduración y reclutamiento en tejidos (Occhipinti et al., 2013). También, la señalización mediada por ICOS-L modula la capacidad adhesiva de células tumorales al endotelio vascular (que expresa ICOS-L), resaltando su posible papel en la diseminación de metástasis y reclutamiento de células polimorfonucleares a sitios de inflamación (Dianzani et al., 2010). Estos hechos abren oportunidades al uso de construcciones ICOS-Fc como fármacos inmunomoduladores con aplicación terapéutica.

### 3.4.4 La interacción ICOS:ICOS-ligando en las respuestas inmunes adaptativa e innata

La interacción entre ICOS e ICOS ligando, considerada como un único par receptor-ligando, participa en distintos tipos de respuestas, principalmente en la inmunidad adaptativa; sin embargo cada vez se observan más evidencias de su participación en la respuesta inmune innata.

Ya hemos mencionado que la coestimulación de ICOS modula un notable número de procesos distintos durante las respuestas inmunes adaptativas, como los siguientes:

- ICOS promueve la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, de un modo probablemente independiente de la señalización de IL-2, proporcionando señal de supervivencia o expansión. ICOS controla el balance de células T efectoras y memoria y el número de T reguladoras naturales Foxp3<sup>+</sup>; por ello, los ratones ICOS KO son deficientes en Treg en la periferia y presentan alteraciones en el pool de células efectoras y memoria (Burmeister et al., 2008).
- ICOS da lugar a la respuesta de determinadas citoquinas entre las que se encuentra la IL-10, responsable de inducir la diferenciación de las células B hacia células memoria y hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Hutloff et al., 1999, Coyle et al., 2000).
- ICOS permite que las células T den una señal efectiva a las células B para el cambio de isotipo y que así sinteticen IgM, IgG e IgE a través de un mecanismo dependiente de la vía de CD40/CD40L (Broides and Conley, 2004, McAdam et al., 2001, Liu et al., 2015).
- ICOS se expresa en las células T de los centros germinales, proporcionando señales críticas a las células B que llevan a la formación de los centros germinales y a la maduración de los anticuerpos (Liu et al., 2015, Leavenworth et al., 2015b, Pedros et al., 2016, Xu et al., 2013).
- La unión de ICOS a ICOS-L activa una cascada de moléculas de señalización intracelular que previenen la apoptosis y conducen a la producción de citoquinas tales como IL-4 e IL-13 (Dong et al., 2001).

También se ha descrito el papel de la interacción ICOS:ICOS-L en células implicadas en la inmunidad innata. Es el caso de la importancia de estos coestimuladores durante el desarrollo de las células NKT invariantes NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (iNKT), que tiene lugar en el timo. Las células iNKT, tanto tímicas como periféricas, expresan ICOS de un modo constitutivo, y su expresión es necesaria para el correcto desempeño de su función, incluyendo su actividad antitumoral y la producción de citoquinas, así como para su supervivencia, del mismo modo que se ha descrito para células T (Akbari et al., 2008, Kaneda et al., 2005, Chung et al., 2008).



Hasta la fecha, se conocía que ICOS-L se expresa en células B, otras APCs y células epiteliales, pero no por células T o células linfoides innatas, y que se regula negativamente al unirse a ICOS como mecanismo inmunorregulador (Watanabe et al., 2008). Recientemente se ha descrito que las ILC2 humanas y murinas expresan tanto ICOS como ICOS-L y que su interacción es crucial para la función y la supervivencia homeostática de estas células (Maazi et al., 2015, Paclik et al., 2015). Otras células de la inmunidad innata que expresan simultáneamente ICOS e ICOS-L son las BMDCs humanas, en las que interaccionan de forma homotípica y aumentan la secreción de citoquinas inducida por receptores NOD2 (Hedl et al., 2014). Esta señalización requiere residuos de arginina en el dominio citoplásmico de ICOS-L para permitir el reclutamiento de distintas quinasas y moléculas de señalización. Determinados tipos de pacientes de enfermedad de Crohn presentan polimorfismos (SNP) en el gen de ICOS-L, que determinan menores niveles de expresión y deficiencias en su señalización. Estos hechos sugieren que ICOS-L amplifica señales mediadas por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (por ej. NOD2) y contribuye a la homeostasis inmune (Hedl et al., 2014).

El papel de ICOS en la biología de las células NK está muy poco estudiado. Se ha descrito que la estimulación de las células NK murinas con citoquinas aumenta la expresión de ICOS, y que las células NK activadas a través de ICOS lisan de un modo más eficiente a las células tumorales que expresan MHC de clase I e ICOS-L, indicando que las funciones NK vienen reguladas por ICOS (Ogasawara et al., 2002). Por otra parte, las células de melanoma y otras líneas tumorales que expresan ICOS-L promueven la activación y expansión de células T reguladoras; se deduce de esto que puede existir una interrelación NK-Treg modulando la respuesta antitumoral (Martin-Orozco et al., 2010, Strauss et al., 2008). Otros miembros de esta familia de coestimuladores, incluyendo CD28 y CTLA-4 desempeñan también un papel en la activación de respuestas dependientes de NK. La activación de NK por IL-2 u otras citoquinas modula la expresión de CD28 y de CTLA-4 en estas células y la respuesta anti-tumoral incluye la participación de ambos (Stojanovic et al., 2014); además, ratones deficientes en estos genes tienen afectada la secreción de IFN- $\gamma$  por las NK.

En definitiva, el papel de ICOS en el desarrollo y supervivencia de las células NK aún no ha sido determinado y su posible implicación como molécula coestimuladora en la función NK ha sido muy someramente descrita. Además, este papel en las NK ha de ser explorado en el contexto del conjunto de la respuesta inmune, considerando las interacciones que estas células tienen con otras participantes tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa.



# Objetivos

### 4. Objetivos

Al estudiar el fenotipo de las poblaciones linfoides en los ratones ICOS-KO observamos defectos en el número de células NK; este hallazgo ha sido fundamental para el planteamiento de esta Tesis Doctoral.

El propósito general de este estudio es analizar la implicación de la molécula coestimuladora ICOS en la homeostasis y función de las células NK y otras subpoblaciones innatas. Para ello, mediante el uso de modelos de ratón deficientes en ICOS, se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Análisis de la implicación de ICOS en la homeostasis, el desarrollo y la diferenciación de células NK.
2. Caracterización de la expresión de ICOS e ICOS-ligando en poblaciones de la inmunidad innata: NK y células dendríticas.
3. Participación de ICOS en las funciones efectoras de las células NK y en su relación con las células dendríticas.
4. Papel de ICOS e ICOS-ligando en el contexto de la respuesta inmune *in vivo* frente a estímulo infeccioso.

Los resultados redundaran en un mejor conocimiento del papel de ICOS e ICOS-L en distintas poblaciones celulares y en la exploración de nuevas terapias para el control de enfermedades infecciosas y cáncer.

---

# Materiales y Métodos

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Animales de experimentación

Para los ensayos experimentales de esta Tesis se utilizaron grupos de ratones de sexo y edad homogénea, de 8 a 13 semanas, de las siguientes cepas de ratón:

- C57BL/6: Procedentes de Harlan-Envigo. Fueron utilizados para distintos ensayos y como controles de los ratones ICOS-KO.
- B6.129S1-Icostm1Flv (ICOS<sup>-/-</sup> o ICOS-KO): Cedidos por el Dr. R.A. Flavell (Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, EEUU).

Los animales fueron criados y mantenidos en condiciones libres de patógenos en los animalarios del Instituto de Salud Carlos III y, en ocasiones, en el del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid). Los ratones fueron alojados en cubetas en racks ventilados, en condiciones estándar de temperatura y humedad, con ciclo luz/oscuridad 12:12. Se les proporcionó agua y pienso esterilizados *ad libitum*.

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron realizados de acuerdo con el RD 53/2013 y la Ley 32/07 vigentes en nuestro país; y fueron aprobados por el comité ético del ISCIII (CBA 67-2013-v2 y PROEX 330/15.)

### 5.2 Tampones, medios de cultivo, anticuerpos y otros reactivos

#### Tampones para manejo/purificación/marcaje de células

- PBS: Solución salina con tampón fosfato: NaCl 0,13 M, KCl 2,7 mM, HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 8 M y HPO<sub>4</sub>K 1,4mM; pH 7,2.
- Solución lisis eritrocitos: NH<sub>4</sub>Cl 0.75%, HEPES 20mM; pH 7.2
- Tampón de Tinción (SB, Staining buffer): PBS 1x, FCSi 5%, NaN<sub>3</sub> 0.1%
- Tampón fijación células: NaCl 0.9%, paraformalehido 1% en dH<sub>2</sub>O; pH 7.4
- Tampón para selección magnética: PBS, EDTA 2 mM, BSA 0,5%; pH 7,2

#### Tampones para ELISA de citoquinas

- Tampón de lavado: PBS, Tween20 (0,05%).

### **Tampones para activación, lisis celular e inmunoprecipitación**

- Tampón de activación: PBS, glucosa 0.1%,  $\text{Ca}^{+2}$  1mM,  $\text{Mg}^{+2}$  1mM, HEPES 10mM; pH 7.2
- Tampón de lisis: Tris/HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 1%, pH 7,6. Se añadieron inhibidores de proteasas como: PMSF 1 mM, Aprotinina 10  $\mu\text{g/ml}$ , Leupeptina 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se añadió también  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM como inhibidor de fosfatasas.
- Tampón de lavado Tritón: Tris/HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 0,1%; pH 7,6.
- Tampón de lavado CHAPS: Tris/HCl 50 mM, NaCl 300 mM, CHAPS 2mM; pH 7,6.

### **Tampones para electroforesis en gel de poliacrilamida e “immunoblot”**

- Tampón gel inferior: Tris base 1,5 mM, SDS 0,4% en agua destilada; pH 8,8.
- Tampón gel superior: Tris base 0,5 M, SDS (0,4%); en agua destilada; pH 6,8.
- Tampón para electrodos: Tris base 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 1% en agua destilada; pH 8,3.
- Tampón de muestra: Tris base 62,5 mM, Glicerol 10%, SDS 2,3%, 2-mercaptoetanol 5% y trazas de azul de bromofenol 0,05% en condiciones reductoras; pH 7,6.
- Tampón de transferencia: CAPS 10 mM, en agua; pH 11.
- Tampón de lavado TBS-T: Tris/HCl 20 mM, pH 7,6), NaCl 150 mM y Tween 20 0,05%.
- Tampón de lavado PBS-T: PBS, Tween-20 1%.
- Tampón de “stripping”: Tris/HCl 62,5 mM, SDS 70 mM, 2-mercaptoetanol 0,68%; pH 6,7.
- Tampón de bloqueo: PBS-T o TBS-T, Leche desnatada 3%, PBS-T/L y TBS-T/L respectivamente.
- Tampón anticuerpo primario: PBS-T o TBS-T con Gelatina (0,2%) y Azida sódica (0,1%)

### **Tampones Biología Molecular**

- Tampón TAE 1x: Tris-acetato (40 mM), Ac. Acético 20mM, EDTA (1 mM); pH 8,0.

### **Medios de Cultivo**

Medio Click (CC): Se empleó para todos los cultivos realizados. La base es el medio DMEM (Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con: Suero fetal bovino inactivado al 10%, aminoácidos esenciales MEM 50x a 1,5x final (Gibco), aminoácidos no esenciales MEM 100x a 3x final (Gibco), 1 ml/100 ml de precursores de ácidos nucleicos 100x (adenosina, citosina, guanosina, uridina) a 0,1 mg/ml final de cada uno de los precursores diluidos en agua, vitaminas MEM 100x a 1x final (Gibco), piruvato sódico 100 mM a 2,5 mM final (Gibco), L-glutamina 200 mM a 2 mM final (Gibco), HBSS 10x (solución compensada de sales de Hank) a 0,15x final (Gibco) para compensar el aumento de volumen de los aditivos, 2-mercaptoetanol 0,1 M en agua a 40  $\mu\text{M}$  final, gentamicina a 40  $\mu\text{g/ml}$  final (Sigma) y ajustando el pH (7,0-7,4) con NaOH (Peck and Bach, 1973).

**Anticuerpos**

Los anticuerpos empleados, purificados, sin marcar o marcados para citometría de flujo, tanto primarios como secundarios, están detallados las tablas que aparecen a continuación.

**Tabla 2. Anticuerpos Monoclonales para citometría de superficie**

Especificidad Anti-	Nombre	Marcaje	Especie	Isotipo	Procedencia
CD3	145-2C11	PE.Cy7	Hámster	IgG	eBioscience
CD3	145-2C11	PE.Cy7/APC/ APC-Cy7	Hámster	IgG	BioLegend
CD4	RM4.5	FITC/ PE-Cy7/APC	Rata	IgG2a	eBioscience
CD4	GK1.5	PE	Rata	IgG2b	BD Pharmingen
CD8	eBioH35-17.2	FITC	Rata	IgG2b	eBioscience
CD11b	M1/70	FITC/ APC-eFluor780	Rata	IgG2b	eBioscience
CD11c	N418	Alexa Fluor 488/ PE	Hámster	IgG	BioLegend
CD19	eBio1D3	PE-Cy7	Rata	IgG2a κ	eBioscience
CD25	PC61.5	PE/APC	Rata	IgG1	eBioscience
CD27	LG.7F9	PE	Hámster	IgG	eBioscience
CD28	E18	PE	Ratón	IgG2b	Biolegend
CD43	eBIOR2/60	FITC	Rata	IgM	eBioscience
CD49B	DX5	Pe-Cy7	Rata	IgM	eBioscience
CD80	16-10 <sup>a</sup> 1	APC	Hámster	IgG	BioLegend
CD86	GL1	APC-Cy7	Rata	IgG2a	BioLegend
CD62L	MEL-14	APC	Rata	IgG2a	Immunotools
CD69	H1.2F3	PE	Hámster	IgG	Immunotools
CD107a (LAMP-1)	eBio1D4B	PE-Cy7	Rata	IgG2a	BD Pharmingen
CD107a (LAMP-1)	eBio1D4B	Alexa Fluor 488	Rata	IgG2a	eBioscience
CD122	TM-b1	FITC	Rata	IgG2b	eBioscience
CD127	ATR34	PE	Rata	IgG2a	eBioscience
CD132	TUGm2	PE	Rata	IgG2b	BioLegend
CD244.2	M2B4	Alexa Fluor 647	Ratón	IgG1	BioLegend
CD253 (TRAIL)	N2B2	PE	Rata	IgG2a	BioLegend
CD262/TRAIL-R2	MD5.1	Biotina	Hámster	IgG	BioLegend
ICOS-L (CD275)	HK5.3	Biot./PE	Rata	IgG2a	eBioscience

ICOS (CD278)	C398.4A	Biot./ FITC/ PE/ APC	Hámster	IgG	eBioscience
ICOS (CD278)	7E.17G9	PE	Rata	IgG2b	eBioscience
CD335/ (NKp46)	29A1.4	PE-Cy7	Rata	IgG2a	eBioscience
KLRG1	2F1	FITC	Hámster	IgG	eBioscience
Ly49d	4E5	FITC	Rata	IgG2a	BioLegend
NK 1.1	PK136	PE/ PE-Cy7	Ratón	IgG2a	eBioscience

**Tabla 3. Anticuerpos para citometría intracelular**

Especificidad Anti-	Nombre	Marcaje	Especie	Isotipo	Procedencia
IFN- $\gamma$	XMG1.2	FITC/ PE/ APC	Rata	IgG1	eBioscience
TNF- $\alpha$	MP6-XT22	FITC/ PE/ APC	Rata	IgG1	eBioscience
Granzima A	3G8.5	FITC	Rata	IgG2a	Santa Cruz
Granzima A	3G8.5	PE	Rata	IgG2a	BioLegend
Granzima B	NGZB	FITC/ PE	Rata	IgG2a	eBioscience
Perforina	eBioMAK-D	APC /PE	Rata	IgG2a	eBioscience
IFN- $\alpha$	RMMA-1	FITC	Rata	IgG1	R&D
T-bet	eBio4B10	PE	Ratón	IgG1	eBioscience
Eomes	Dan11mag	PE/ eFluor 660	Rata	IgG2a	eBioscience

**Tabla 4. Anticuerpos purificados para activaciones**

Especificidad Anti-	Nombre	Marcaje	Especie	Isotipo	Procedencia
Control de Isotipo	RTK2758	-	Rata	IgG2a	eBioscience
NK1.1	PK136	-	Ratón	IgG2a	eBioscience
CD278 (ICOS)	7E.17G9	-	Rata	IgG2b	eBioscience
CD278 (ICOS)	C398.4A	-	Hamster	IgG	eBioscience
CD275 (ICOS-L)	HK5.3	-	Rata	IgG2a	eBioscience



Tabla 5. Anticuerpos Control

Especificidad Anti-	Nombre	Marcaje	Especie	Isotipo	Procedencia
Isotipo	HTK888	Alexa Fluor 488/ PE	Hámster	IgG	Biolegend
Isotipo	eBio299Arm	FITC/ PE-Cy7/Biotina	Hámster	IgG	eBioscience
Isotipo	RTK2758	FITC /PE/ PE-Cy7/ APC-Cy7	Rata	IgG2a	Biolegend
Isotipo	eB149/10H5	FITC/ PE/ APC-eFluor780	Rata	IgG2b	eBioscience
Isotipo	eBRG1	FITC/ PE/ APC	Rata	IgG1	eBioscience

### Otros reactivos y productos

Se emplearon inhibidores específicos de distintas subunidades catalíticas de PI3 quinasa incluyendo p110 $\alpha$  (A66, Selleck Chemicals); p110 $\delta$  (IC87114, Symansis Pty.); o p110 $\alpha$  y p110 $\delta$  (ETP-46321, (Martinez Gonzalez et al., 2012, Granda et al., 2013, Aragonese-Fenoll et al., 2016) ).

Se usaron para ensayos de activación las construcciones químeras B7h-Fc (Región variable ICOS-L ratón y región constante humana) e ICOS-Fc (Región variable ICOS ratón y región constante humana), ambas de R&D.

### 5.3 Líneas celulares

#### - Línea celular diana de NK: YAC-1

La línea YAC1 fue cedida por el Dr. José M<sup>a</sup> Rojo (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC). YAC-1 es un linfoma T inducido mediante inoculación del virus de la leucemia Moloney (MLV) en ratones recién nacidos (Kiessling et al., 1975a). Esta línea celular es sensible a la actividad citotóxica natural de las células NK de ratón.

#### - Línea celular B16

La línea celular de melanoma B16.F10 (B16-F10 ATCC CRL6475<sup>TM</sup>), fue cedida por el Dr. José M<sup>a</sup> Rojo (CIB-CSIC). Se trata de una línea originaria de ratones de la cepa C57BL/6J. Se cultivó en medio Click completo.

Esta línea expresa niveles muy bajos del ligando de ICOS (B7h2- ICOS-L, por lo que se prepararon transfectantes para aumentar los niveles de expresión de esta molécula.

Como vector de expresión del ligando de ICOS (ICOS-L, B7h) se empleó el plásmido p-CMV6-Kan/Neo conteniendo el cDNA de B7h de ratón (pB7h plasmid, Origene TrueClone MC202216). Y los transfectantes de B16.F10 fueron obtenidos por nucleofección de  $1.5-2 \times 10^6$  células con 2 mg de DNA plasmídico en 100 ml de solución de nucleofección V (Lonza) y el programa P-20 del Nucleofector I (Lonza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 24 h de cultivo, el medio fué cambiado y se añadió Geneticina (5 mg/ml)(Sigma). Las células resistentes fueron expandidas, seleccionadas por citometría de flujo, y clonadas por dilución límite.

Además en algunos experimentos se realizaron purificaciones celulares por *sorting* para enriquecer al máximo la población de células B16.F10 que expresaban altos niveles de ICOS ligando para ser utilizadas en ensayos de citotoxicidad con células NK.

- *Línea celular para titulación viral: CV-1*

La línea CV-1 fue cedida por la Dra. P. Lauzurica (centro Nacional de Microbiología, ISCIII). CV-1 es una línea celular adherente procedente de riñón de mono verde africano, usada para titulación viral de tejido ovárico de animales infectados con virus *vaccinia*. Las células fueron mantenidas en frasco de cultivo con medio click completo, levantadas con tripsina (Lonza) para los pases y cultivadas a confluencia en placa para la realización de los experimentos de titulación viral.

- *Línea celular SR.D10*

La línea SR.D10 es una línea celular T murina derivada espontáneamente en los cultivos del clon D10.G4.1 de células T CD4+ de ratones AKR/J (Ojeda et al., 1995). Debido a sus características constituye un modelo experimental de gran interés para el análisis de mecanismos de activación en células T (Ojeda et al., 1995), y aquí se ha usado como línea celular control de la expresión génica de ICOS.

Todas las líneas celulares empleadas fueron comprobadas para la presencia de micoplasmas.

- *Células primarias de ratón*

Se emplearon células NK, T y dendríticas que fueron extraídas de bazo, médula ósea o líquido peritoneal de la forma en que se describe a continuación.

### 5.4 Suspensiones de células primarias

Se utilizaron células primarias obtenidas de bazo, médula ósea o líquido peritoneal según el experimento a realizar.

La suspensión de bazo se obtuvo a partir del bazo completo, disgregando el tejido mediante presión sobre tamiz (70  $\mu$ M nylon cell strainer BD Falcon), en placa de Petri con medio Click suplementado con 10% FCSi (a partir de ahora "Click completo", CC). Las células se lavaron según métodos standard, se lisaron los eritrocitos con solución de lisis de eritrocitos y tras nuevos lavados se contaron y ajustaron, en medio CC o el buffer adecuado, a la concentración necesaria para cada experimento.

La médula ósea se obtuvo a partir de huesos de extremidades posteriores mediante disección. Bajo condiciones estériles fémur y tibia fueron limpiados, dislocados y posteriormente lavados con etanol 70%. La médula ósea se extrajo cortando los huesos en sus extremos y haciendo pasar medio de cultivo a través del hueso usando una jeringa con aguja de 27G. El tejido obtenido fue disgregado, lavado y preparado siguiendo el mismo proceso que en el caso del bazo.

La suspensión de líquido peritoneal se obtuvo tras inyección intraperitoneal de 5-10 ml de PBS estéril apirógeno, tras ligero masaje del abdomen del ratón se recuperó el máximo volumen posible del PBS inyectado. La suspensión celular obtenida fue lavada, contada y ajustada de igual modo que en los casos anteriores.

### 5.5 Purificación y cultivo de células NK

Las células NK fueron purificadas utilizando el sistema "NK Cell Isolation Kit II mouse" (Miltenyi Biotec), de selección negativa, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este método se basa en la depleción de subpoblaciones por unión a Abs biotinilados y posterior incubación con bolas magnéticas unidas a Ab anti-biotina; de esta forma las subpoblaciones a desechar quedan retenidas en una columna magnética, mientras que la subpoblación celular de interés es eluída de la columna sin haber sido marcada.

Tras la obtención de la población NK, se lavaron las células dos veces en medio CC y se ajustaron a la concentración deseada en el mismo medio. El rendimiento obtenido fue aproximadamente del 1-1.5% del total de células iniciales del bazo, y la pureza, analizada mediante citometría de flujo, fue del 75-90%; siendo todas ellas células CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup>; sin que se pudieran detectar células de tipo ILC1.

Las suspensiones celulares enriquecidas en células NK, tras separación magnética, se resuspendieron en CC con 2.000 U/ml de hrIL-2 (Immunotools) y se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de cultivo de tejidos (Costar Ref. 3799) p96 de fondo redondo (200ul/pocillo) hasta 7 días. Cada 2-3 días, hasta el séptimo, las células fueron alimentadas, reemplazando la mitad del medio por CC fresco

con hrIL-2 a la misma concentración. A partir del día 4 de cultivo las células NK generalmente ya presentaban un 98-99% de pureza y fueron utilizadas para los experimentos correspondientes hasta el día 7.

### 5.6 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)

Se siguió el método descrito por (Inaba et al., 1992) con algunas modificaciones (Zhu et al., 2007). Tras obtener una suspensión celular estéril a partir de médula ósea como se describió en el punto 2.4, las células se resuspendieron en medio CC suplementado con GM-CSF (50 µg/ml) (Peprotech) a una concentración de  $3 \times 10^6$ /ml en placas de cultivo p6 (Falcon ref. 353046). Tras 48h de cultivo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se eliminaron 2/3 del volumen de células no adherentes, procurando no arrastrar las células dendríticas que crecen formando colonias y quedan ancladas, y se reemplazó por el mismo volumen de medio suplementado con GM-CS. A los dos días se volvió a añadir medio suplementado con GM-CSF.

A los 5-8 días se recogieron las células resultantes, dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) y se utilizaron para los distintos experimentos. Las BMDCs en este estado son células “inmaduras”; en ocasiones fueron estimuladas con LPS (Lipopolisacarido de E.coli serotipo R515 (TLR grade) Enzo) a 100 ng/ml o con PolyI:C a 1 o 10 µg/ml (Invivo), en activaciones *in vitro* durante 24 horas dando lugar a BMDCs “maduras”.

### 5.7 Inmunofluorescencia e inmunoquímica

#### 5.7.1 Tinción de marcadores de superficie y análisis por citometría (FACS)

Para analizar la expresión de moléculas de superficie celular se utilizaron anticuerpos específicos para dichas moléculas (Tabla 2) marcados directamente con el fluorocromo (FITC, PE, PE-Cy7, APC y APC-Cy7) o biotinilados. En este último caso, como reactivo secundario se utilizó estreptavidina acoplada a diferentes fluorocromos; estreptavidina-FITC, -PE y -APCeFluor780 de eBioscience; y estreptavidina- PE-Cy7 y -APC de BioLegend.

Se resuspendieron  $0.1-1 \times 10^6$  células en 100µl de tampón de tinción (SB), y se dispusieron en placas de ensayo de 96 pocillos de PVC y fondo redondo. Se lavaron dos veces por centrifugación (500xg, 5 min, 4°C) en 200 µl de SB, y se realizó un bloqueo resuspendiendo las células en 50 µl de SB con 10% de suero normal de ratón inactivado por calor (NMSi). Tras 10-15 minutos de incubación a 4°C se añadieron los anticuerpos de interés a una concentración saturante, se resuspendieron bien y se incubaron 20-30 minutos a 4°C. En el caso de marcaje directo, tras esta incubación se lavaron las células 3 veces con SB y se resuspendieron finalmente en 300-500 µl SB o alternativamente se fijaron en 150 µl de p-formaldehído al 1% para analizarlas en el citómetro. En el caso de marcaje indirecto con anticuerpos biotinilados, tras el

anticuerpo primario se realizó marcaje adicional durante 20-30 minutos a 4°C con estreptavidina-fluorocromo, siguiendo después el mismo proceso que en el caso de marcaje directo. Para la discriminación de células muertas, se añadió Ioduro de Propidio (IP) a todas las muestras, 5 minutos antes de la adquisición en el citómetro. La adquisición y análisis se realizó en un citómetro FACSCanto (Becton Dickinson) con el programa FACSDiva.

### 5.7.2 Separación celular por citometría de flujo (*sorting*)

En los casos en los que la pureza de la población era muy determinante, tras purificar las células por métodos inmuno-magnéticos, se tiñeron con los anticuerpos adecuados, y por citometría de flujo se separaron las células positivas y/o negativas para la expresión de los marcadores de interés empleando el equipo FACS Aria I (Becton Dickinson). De esta forma se empleó la citometría preparativa para aislar células NK, seleccionadas como células CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> IP<sup>-</sup>, o las células T CD3<sup>+</sup> como CD3<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>. Cuando fue necesario, las células dendríticas BMDCs fueron purificadas mediante *sorting*, como células CD11c<sup>+</sup> IP<sup>-</sup>, o las células de melanoma B16.F10 se enriquecieron también mediante la misma técnica para seleccionar una población con alta expresión de ICOS ligando.

### 5.7.3 Tinción intracelular

#### Valoración de células productoras de citoquinas:

Para la valoración de células productoras de citoquinas, se realizó detección intracelular de estas moléculas (Rojo et al., 2008). Para ello, se activaron las células en placas de 24 pocillos (2x10<sup>6</sup>/ml, 2ml/ pocillo) con el éster de forbol PMA (20 ng/ml)(Sigma) e ionomicina (1 μM)(Calbiochem) en CC durante 5 horas a 37°C, de las cuales, las 3,5 horas finales fueron en presencia de Brefeldina A a 10 μg/ml (Sigma), para prevenir la secreción proteica y acumular mayor cantidad de citoquinas intracelularmente.

Tras la incubación, las células se resuspendieron, se lavaron con PBS frío dos veces y se prosiguió con el protocolo de fijación/permeabilización especificado en el kit de tinción intracelular BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, se resuspendieron en SB y se analizaron por citometría de flujo.

#### Valoración de factores de transcripción y otras moléculas intracelulares

Para la tinción de factores de transcripción de la familia STAT (fosforilados o no), se empleó el Kit de tinción intracelular BD Cytofix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Biosciences), utilizando el buffer de permeabilización III para moléculas de señalización intracelular, siguiendo instrucciones del fabricante. Para la tinción de factores de transcripción T-bet y Eomes y otras moléculas intracelulares como

granzimas y perforina, las células se tiñeron, fijaron y permeabilizaron siguiendo las instrucciones del Kit para la detección de FoxP3 (eBioscience).

### 5.7.4. Valoración de apoptosis espontánea. Tinción con Anexina V/ IP

Las células apoptóticas se valoraron mediante tinción con anexina V y yoduro de propidio. La Anexina V es una proteína con alta afinidad por el fosfolípido de membrana fosfatidil serina, que queda expuesto al exterior de la membrana celular en el caso de células apoptóticas. Al combinarse la Anexina V con el yoduro de propidio (IP), se pueden distinguir células en apoptosis temprana o tardía.

Para los estudios de apoptosis, se utilizó el kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Bender-eBioscience) siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de pasar las células por el citómetro se diluyeron en 300 µl de PBS y se les añadió IP a una concentración final de 0.2 µg/ml.

### 5.7.5 Valoración de la degranulación celular: Expresión de CD107a (LAMP-1)

Se utilizó la expresión de CD107a (LAMP-1) como medida de la degranulación e indicador de la liberación de vesículas líticas y actividad citotóxica de las células. Para ello, células de bazo o células NK purificadas, junto con los estímulos apropiados, fueron incubadas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 1 h en presencia del anticuerpo que reconoce CD107a (Alter et al., 2004). A continuación se añadió Monensina (solución BD GolgiStop™, BD Biosciences) para bloquear el transporte intracelular, a la concentración recomendada por el fabricante y las células se mantuvieron incubando durante 3 horas más (Alter et al., 2004). Pasado ese tiempo las células se recogieron y se tiñeron en superficie con los marcadores adecuados antes de llevar a cabo el análisis mediante citometría de flujo.

### 5.7.6 Cuantificación de citoquinas por ELISA

Se valoró la cantidad de citoquina producida en cultivo mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Tras el ensayo de activación celular correspondiente, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y guardados a -20°C hasta su posterior análisis. La concentración de las distintas citoquinas fue valorada empleando ELISAs comerciales tipo “sándwich”, con Abs pareados de captura y detección, siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISA Ready-Set-Go® y Platinum ELISA, eBioscience).

### 5.8 Ensayos de activación celular y proliferación *in vitro*

#### 5.8.1 Ensayos de activación de células NK en placa.

Se recubrieron el número de pocillos necesarios de placas p96 (Costar Ref.3598) con 50  $\mu$ l del correspondiente anticuerpo monoclonal, proteína de fusión, o control de isotipo diluidos en PBS; y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se llenaron con CC. Las células, previamente bloqueadas con 0.5  $\mu$ g/ml de anti CD16/32 se dispensaron sobre los pocillos en un volumen final de 100-200  $\mu$ l a una concentración de  $10^6$  células/ ml. Las placas fueron cultivadas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 24 horas para el posterior estudio de las células mediante citometría de flujo o bien se recogieron los sobrenadantes para su análisis mediante ELISA.

#### 5.8.2 Activación con bolas de látex y preparación de lisados para *immunoblot*.

Para analizar fosforilaciones en moléculas señalizadoras intracelulares mediante *immunoblot* se activaron las células con bolas de látex preacopladas con anticuerpos.

##### Preparación de las bolas de látex:

50  $\mu$ L de suspensión de microesferas de látex (a  $800 \times 10^6$  microesferas/ml, Polybead® Polystyrene 4.5 Micron Microspheres (Polysciences, Inc.) en 1 ml de PBS fueron preincubadas con los anticuerpos activadores purificados (anti-NK1.1, IgG2a control, anti-ICOSL y anti-ICOS, Tabla 4), todos a 5  $\mu$ g/mL. Tras incubar toda la noche con rotación, las microesferas fueron lavadas 3 veces con Click completo y se resuspendieron a la concentración necesaria ( $5 \times 10^7$  bolas/ml) en Tampón de activación (PBS/Glucosa/HEPES) suplementado con hrIL-2 (2x, 1000 U/mL).

##### Activación de las células:

Las células NK se lavaron dos veces con medio Click completo y se ajustaron a la concentración adecuada, se mantuvieron en reposo durante 30 min a 37°C, a continuación se añadió NMSi hasta el 10% para bloquear receptores Fc y se dejaron 1h bloqueando en hielo. A continuación se tomaron la células necesarias para realizar la activación, se lavaron y se ajustaron en Tampón de Activación (PBS/Glucosa/HEPES). Las células se mezclaron V:V en una proporción 4 bolas:1 célula y se incubaron a 37°C durante 30 min. Para detener la activación se añadió 1 ml de PBS/0,5 mM EDTA/0,2 mM Ortovanadato frío, y se centrifugaron a 4°C 5' 2000 rpm.

Preparación lisados celulares:

El pellet de bolas:células se resuspendió en Tampón de lisis y se incubó durante 30 minutos a 4°C, tras centrifugar a 4°C 5' 1500xg , se tomó el sobrenadante del lisado y se mezcló V:V con Tampón de Muestra reductor 2x para SDS-PAGE.

Electroforesis SDS-PAGE e inmunoblot:

Las muestras procedentes de lisados celulares, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 o 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE) aplicando una corriente constante de 25 mA por gel.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (Inmobilon P, Millipore), empleando cubetas de transferencia Tran-Blot (Bio-Rad), en tampón de transferencia CAPS a una corriente constante de 320 mA durante 1 hora. Las proteínas inmovilizadas en la membrana fueron bloqueadas a temperatura ambiente y agitación con una solución de PBS-T o TBS-T con leche desnatada (PBS-T/L o TBS-T/L respectivamente), dependiendo del antígeno a detectar. En los casos en los que se quería detectar motivos fosforilados se añadió ortovanadato de sodio (1 mM final) al tampón TBS-T/L. Tras dos horas de bloqueo las membranas fueron lavadas 2 veces (15 minutos cada vez) con TBS-T o PBS-T y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en agitación con el anticuerpo de interés (Tabla 6) diluido a la concentración adecuada para cada ensayo. Tras lavarse las membranas 4 veces con TBS-T o PBS-T se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa (anti-ratón-HRPO, anti-conejo-HRPO), diluido en tampón TBS-T/L o PBS-T/L.

**Tabla 6. Anticuerpos empleados para inmunoblot.**

Especificidad	Tipo	Procedencia
Anti-pERK	Anticuerpo policlonal de conejo	Promega
Anti-ERK	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pP38	Anticuerpo policlonal de conejo	Cell Signaling Technology
Anti-P38	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pAkt (Ser473/ Thr308)	Anticuerpos monoclonales de conejo	Cell Signaling Technology
Anti-Akt	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-conejo HRPO	Anticuerpo policlonal de cabra	Sigma
Anti-ratón -HRPO	Anticuerpo policlonal de conejo	Sigma



Finalmente, se lavaron las membranas 4 veces con TBS-T o PBS-T y se procedió a la detección de la señal por quimioluminiscencia (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate system, Pierce) y autoradiografía en películas KODAK X-OMAT UV film o AGFA Curix RP2 Plus Medical X-Ray Film reveladas en un AGFA Curix RP-2. En algunos casos las membranas fueron utilizadas nuevamente, para esto se eliminaron los anticuerpos ya unidos con un tampón reductor (Tampón de “stripping”) durante 30 minutos a 56°C. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas fue realizado con el programa Image J (Image J 1.38x; National Institutes of Health).

### 5.8.3 Medida de proliferación/viabilidad celular

Se utilizó el método colorimétrico descrito por Mossman (Mosmann, 1983). A 100  $\mu$ l de cultivo se le añadieron 20  $\mu$ l de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) a una concentración final de 0.4 mg/ml. El anillo tetrazólico se rompe por enzimas mitocondriales generando precipitados azul oscuro de formazán, que son disueltos por adición de una solución de isopropanol conteniendo HCl 0,04 N (100  $\mu$ l/pocillo). Esta reacción se produce solo en células vivas (2-4 horas a 37°C) y se puede cuantificar midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

### 5.8.4 Ensayo de inhibidores específicos de PI3 quinasa.

Se analizó el efecto de distintos inhibidores, específicos para distintas subunidades de PI3 quinasa, sobre las células NK para ver su efecto directo sobre viabilidad y la producción de citoquinas.

Se ensayaron los diferentes inhibidores en curva de concentración sobre células NK (preactivadas con 2000 U/ml durante 4 días). El ensayo se realizó en placa de cultivo de p96 a una concentración de  $10^6$  células/ml en 200  $\mu$ l/pocillo; a las 24 horas se recogieron los sobrenadantes (100  $\mu$ l/pocillo) para cuantificar la producción de IFN- $\gamma$  (por ELISA) y también se cuantificó la proliferación celular con MTT.

### 5.8.5 Ensayo de citotoxicidad celular.

Se utilizaron células NK purificadas mediante selección negativa, o bien NK preactivadas durante 4-6 días con IL-2 (2000 U/ml), que funcionaron como células efectoras en ensayos de citotoxicidad. Como células “diana” se utilizaron las siguientes líneas celulares: línea tumoral murina YAC-1 (sensible a las células NK), y la línea celular de melanoma B16.F10. Dichas células diana fueron marcadas con CFSE (Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células efectoras y las células diana marcadas con CFSE, se mezclaron a las proporciones indicadas, en placas estériles de 96 pocillos, disponiendo  $10^4$  células diana por pocillo y un número variable de células efectoras, todo ello por duplicado (Lecoeur et al., 2001). Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C

y 5% CO<sub>2</sub>. Entonces se procedió a teñir las muestras con IP durante 5 minutos, que fueron analizadas inmediatamente con un citómetro FACSCanto (BD) y analizadas usando el software FACSDiva (BD).

Se valoró la lisis celular analizando en cada uno de los casos las células diana vivas como IP-CFSE<sup>+</sup> y el porcentaje de lisis se calculó como 100 - % células vivas. Siendo la lisis basal el porcentaje de lisis calculado en ausencia de células efectoras; el porcentaje de citotoxicidad específica (% CTX) para cada muestra se calculó como:

$$\% \text{ CTX específica} = 100 \times (\% \text{Lisis en la muestra} - \% \text{Lisis basal}) / 100 - \% \text{Lisis basal}.$$

### 5.9 Ensayos *in vivo*

#### 5.9.1 Activación con PolyI: C

El ácido poliinosínico-policitídílico (PolyI:C) es un análogo sintético de ARN de doble cadena (dsARN), un patrón molecular asociado a infecciones virales, que es reconocido por el receptor TLR-3 y otros receptores citosólicos, provocando la inducción de citoquinas inflamatorias, incluyendo interferones de tipo I, TNF- $\alpha$  e IL-6. Para activar la respuesta inmune en los ratones procedimos a inocular intraperitonealmente 150  $\mu$ g de PolyI:C preparado siguiendo las instrucciones del fabricante y suspendido en PBS estéril apirógeno (Sigma). Se inocularon también ratones control en las mismas condiciones pero solo con PBS. Tras 8-18 horas se obtuvo sangre de los animales anestesiados y se separó el suero que fue utilizado para la valoración de diversas citoquinas por ELISA. Una vez sacrificados los ratones, se extrajeron también el bazo y el líquido peritoneal; de los que se prepararon suspensiones celulares para analizar mediante citometría de flujo el estado de las distintas subpoblaciones.

#### 5.9.2 Infección con virus *vaccinia*

Se utilizó el virus *vaccinia* (VACV-OVA<sub>257-264</sub> (codifica para el péptido MSIINFEKL)), proporcionado por el Dr. Daniel López (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII). Se inocularon 10<sup>5</sup> unidades formadoras de placa (pfu) del virus en PBS que fueron inyectadas intraperitonealmente en ratones hembras de 8-12 semanas. A las 48 horas los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron de ellos bazo, líquido peritoneal y ovarios para analizar la respuesta de las células NK y el título viral respectivamente.

La carga viral en los ovarios fue medida mediante ensayo de formación de placas de lisis (Martinez et al., 2008). Brevemente, a los dos días de la infección los ovarios fueron extraídos y almacenados en PBS a -80°C hasta su uso. Posteriormente los ovarios fueron homogeneizados mecánicamente, mediante tres ciclos de congelación descongelación y finalmente sonicación. Se prepararon diluciones seriadas de estos lisados que fueron añadidas a cultivos confluentes de células CV-1 y cultivados (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante

24 horas. Tras ese tiempo se determinó el número de placas de lisis producidas en los cultivos, mediante tinción de estos con una solución de cristal violeta.

A partir del bazo y del líquido peritoneal se prepararon suspensiones celulares para analizar mediante citometría de flujo el estado de las distintas subpoblaciones.

## 5.10 Genotipado y cuantificación de la expresión génica

### 5.10.1 Genotipado de los ratones ICOS-KO

Para hacer el genotipado de los ratones, se extrae el ADN genómico a partir de un fragmento de cola cortado entre las 3 y 4 semanas de edad. El genotipado se realizó utilizando un kit comercial de extracción rápida de ADN (REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit- Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN obtenido se sometió a reacción de PCR, usando la mezcla de reacción del mismo kit y con un programa de amplificación diseñado para amplificar parte de la secuencia de ICOS ([https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5\\_MASTER\\_PROTOCOL\\_ID,P5\\_JRS\\_CODE:22988,007019](https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:22988,007019)); y empleando para ello los oligonucleótidos de ICOS indicados en la Tabla 7, junto con los correspondientes al control interno (IL-2). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE para resolver el tamaño de los fragmentos amplificados, empleando un patrón de peso molecular de 100pb (Naborlab).

**Tabla 7. Oligonucleotidos para PCR convencional**

Nombre	Secuencia
ICOS Fw común	ACCCTCATCCATGCAGTGATTC
ICOS Rv WT	GGCTACAGAATGAGTTGCACAAG
ICOS Rv KO	CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA
IL-2 Fw	CTAGGGCCACAGAATTGAAAGATCT
IL-2 Rv	GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC

### 5.10.2 Obtención ARN y ADNc.

El ARN fue extraído de diferentes poblaciones celulares enriquecidas o bien de líneas celulares, empleando el kit comercial *mirVana*<sup>™</sup> miARN Isolation Kit (Ambion-Life technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARNs fueron cuantificados espectrofotométricamente usando Nanodrop <sup>™</sup> 1000 y su calidad fue valorada mediante electroforesis con el Bioanalizador (Agilent), considerando como buenos aquellos ARNs con un índice RIN superior a 9. En ocasiones las células fueron almacenadas en solución

estabilizadora de ARN (RNA later solution- Ambion) siguiendo las insrucciones del fabricante para su posterior extracción.

Los ADNcs fueron generados a partir de 1-5 µgr of ARN, la misma cantidad en cada experimento, en presencia de oligonucleótidos aleatorios (random hexamer primers), usando el kit ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand ADNc Synthesis (Invitrogen- Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.10.3 Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR

Los niveles de expresión génica de los distintos genes evaluados fueron determinados mediante PCR a tiempo real usando iQ5 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories) con reacciones de PCR que incluían iQ™ SYBR® Green Supermix, 5ng de ADNc y 500 nM de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Oligonucleotidos para q-PCR**

Nombre	Secuencia
Actina-F	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG
Actina-R	ACCAGAGGCATACAGGGACA
TBP-F	GGCGGTTTGGCTAGGTTT
TBP-R	GGGTTATCTTCACACACCATGA
P85 alfa- F	GAATGTTCGACTCTATACAGAACACAA
P85 alfa-R	CATCTCCAAGTCCACTGACG
p85beta-F	CCCTTGGATGGATCTTCTGA
p85beta -R	GGGTCAGGTGGGGAGAAC
p110a-F	GACAAGAACAAGGGCGAGAT
p110a-R	CAGTACCCAGCGCAGGAC
p110b-F	AGAAGCTGGCTTGGACCTG
p110b-R	CAGAGCGATCTCCTGTTGCT
p110c1-F	AACAATCTCCGCCACAA
p110c1-R	CACTCCAGACTTTTCTTTATCTTCTT
p110d-F	AGCTGCTCAAAGATATCCAGT
p110d-R	TGCTTTAGCGCCTCTTCCT
ICOS-F	GCACTGGAGGAGAAGACTGC
ICOS-R	CCGAGCCATTGATTTCTCC
ICOS-L-F	CGCACCATGCAGCTAAAGT
ICOS-L-R	AAACATGGAGCTTCTTCCAAAC

Los datos obtenidos de PCR a tiempo real fueron analizados mediante el método de comparación de ciclos de amplificación o *cycle threshold* (CT) (Livak and Schmittgen, 2001), normalizados utilizando como controles internos ( $\beta$ -actina o TBP (proteína de unión a TATA)) según el elegido como óptimo para cada tipo de experimento, comprobando previamente que su expresión no cambiaba en las condiciones estudiadas. Los resultados de expresión están relativizados a la expresión de cada gen en las muestras procedentes de células NK WT.

### 5.11 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software Graphpad Prism V5.02.

Los datos son mostrados como media +/- error estándar de la media (SEM), excepto donde se especifique de otro modo. Habitualmente, los análisis se realizaron comparando dos poblaciones entre sí mediante el test estadístico de t-Student, excepto indicación en contrario. \* indica diferencias significativas entre barras adyacentes o en las poblaciones indicadas en la figura. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.



# Resultados

## 6. Resultados

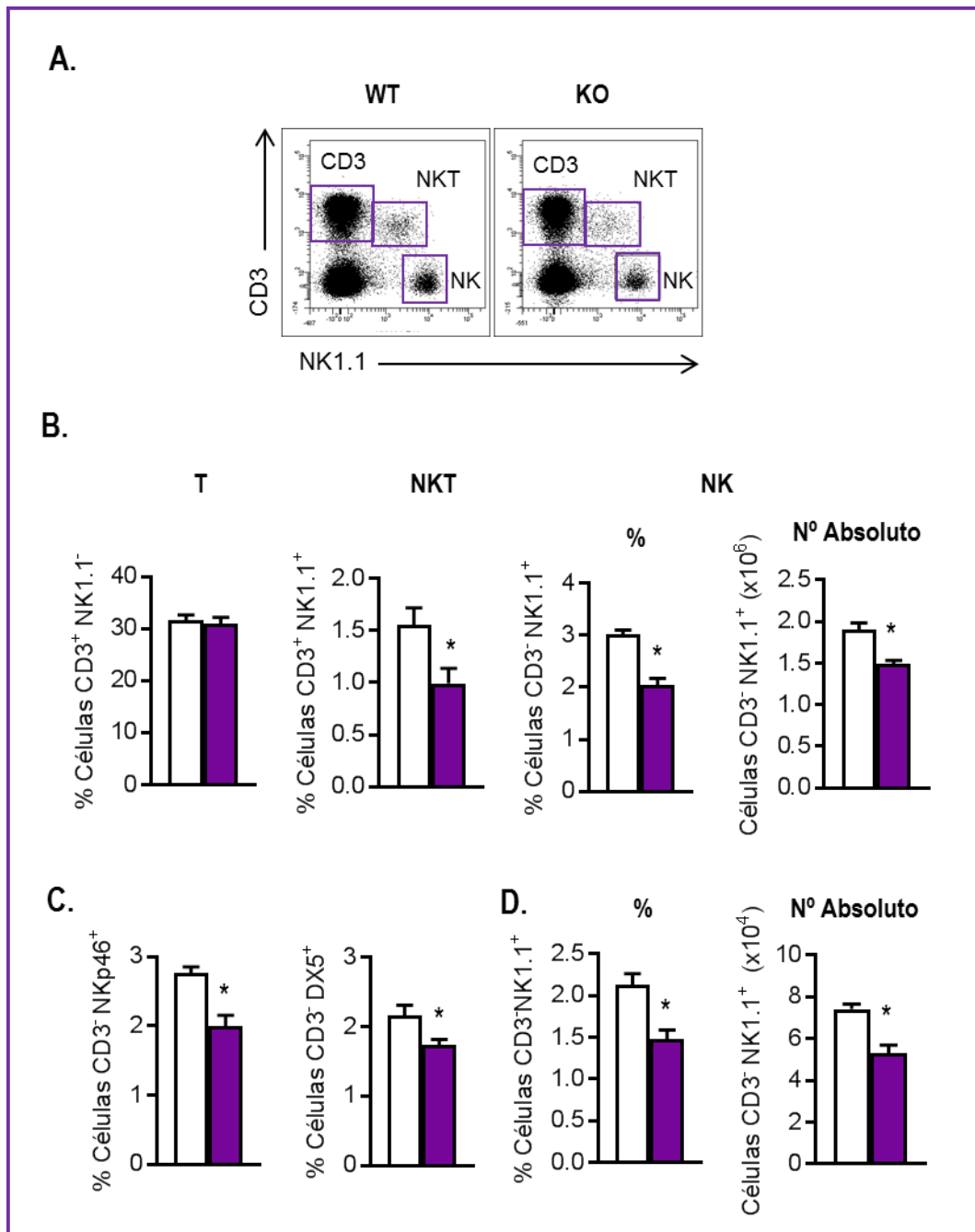
### 6.1 Los ratones ICOS-KO tienen un número reducido de células NK y un incremento de apoptosis espontánea.

Para examinar las consecuencias funcionales de la deficiencia de la molécula coestimuladora ICOS, analizamos mediante citometría de flujo diferentes subpoblaciones linfoides en el bazo de ratones ICOS-KO y ratones control (WT) de la estirpe C57BL/6 (Figura 11 A). No encontramos diferencias significativas en los ratones ICOS-KO respecto a los linfocitos T totales (células CD3<sup>+</sup>), pero sí un menor porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD62<sup>-</sup> de memoria y células NKT (CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>) (Figura 11 B, y datos no mostrados) corroborando datos descritos previamente (Burmeister et al., 2008). Observamos una frecuencia significativamente inferior de células CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> (NK en lo sucesivo) que se corresponde con números absolutos más bajos de dichas células (Figura 11 B).

El marcaje de las poblaciones NK basado en la expresión de otros marcadores, como NKp46 o DX5 (CD49b), que permite excluir otras células NK1.1<sup>+</sup> distintas de las NK convencionales, como las ILC1, rindió conclusiones similares a las obtenidas con el marcaje de NK1.1, indicando un menor porcentaje de células NK convencionales en los ratones ICOS-KO (Figura 11 C)

La reducción en el número de células NK en el bazo de los ratones ICOS-KO nos planteó la cuestión de si estaría afectado su desarrollo en la médula ósea o su homeostasis en la periferia. Encontramos células CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> en la médula ósea de ratones ICOS-KO aunque en frecuencia y números más bajos que los presentes en los controles WT (Figura 11 D), lo que sugiere un defecto en el desarrollo de las NK en ausencia de ICOS.

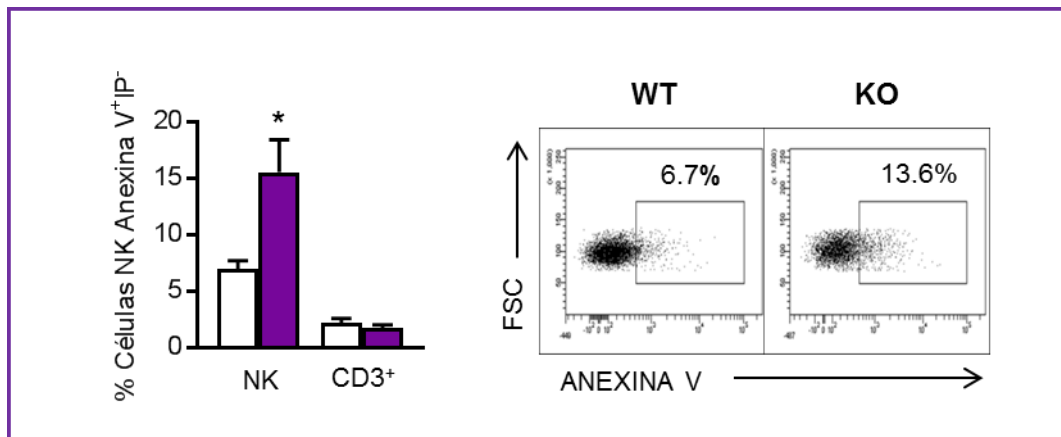
ICOS participa en la homeostasis de células Treg naturales, produciéndose un incremento de apoptosis de esas células en la periferia de ratones ICOS-KO (Burmeister et al., 2008). Por ello analizamos si la ausencia de ICOS podría también afectar la apoptosis espontánea de las NK en estos animales, justificando la disminución celular encontrada y asignando un papel a ICOS en la homeostasis de NK. Comprobamos que la apoptosis espontánea, medida como porcentaje de células AnexinaV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>, estaba incrementado en la subpoblación NK del bazo de ratones ICOS-KO (Figura 12). Este aumento de la apoptosis no se observó en otras poblaciones linfoides como las células T CD3<sup>+</sup> totales (Figura 12), aunque sí se ha observado en pequeñas subpoblaciones de células T como Treg naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (datos no mostrados). Los experimentos usando un ensayo de apoptosis alternativo con inhibidores de caspasa marcados fluorescentemente (FLICA) produjeron resultados similares (no mostrado).



**Figura 11. Ratones ICOS-KO presentan una disminución en el número de células NK en bazo y en médula ósea.**

**A.** Dot-plots de un análisis representativo en el que se indican las distintas subpoblaciones (CD3, NKT y NK) en el bazo de ratones C57BL/6 (WT) o ICOS-KO (KO). **B.** Porcentajes de distintas subpoblaciones T (CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>) y NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) en células de bazo de animales WT e ICOS-KO. Se muestran también valores de NK en número absoluto de células. **C.** Porcentajes de NK de bazo seleccionadas con marcadores Nkp46 y DX5 en ratones WT e ICOS-KO. **D.** Porcentajes y números absolutos de células NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) en médula ósea de ratones WT e ICOS-KO. Los datos vienen referidos a la población linfóide (FSC/SSC) de médula ósea. Datos de 5-12 experimentos. \*p < 0.05. Barras: WT (blancas) y KO (moradas)





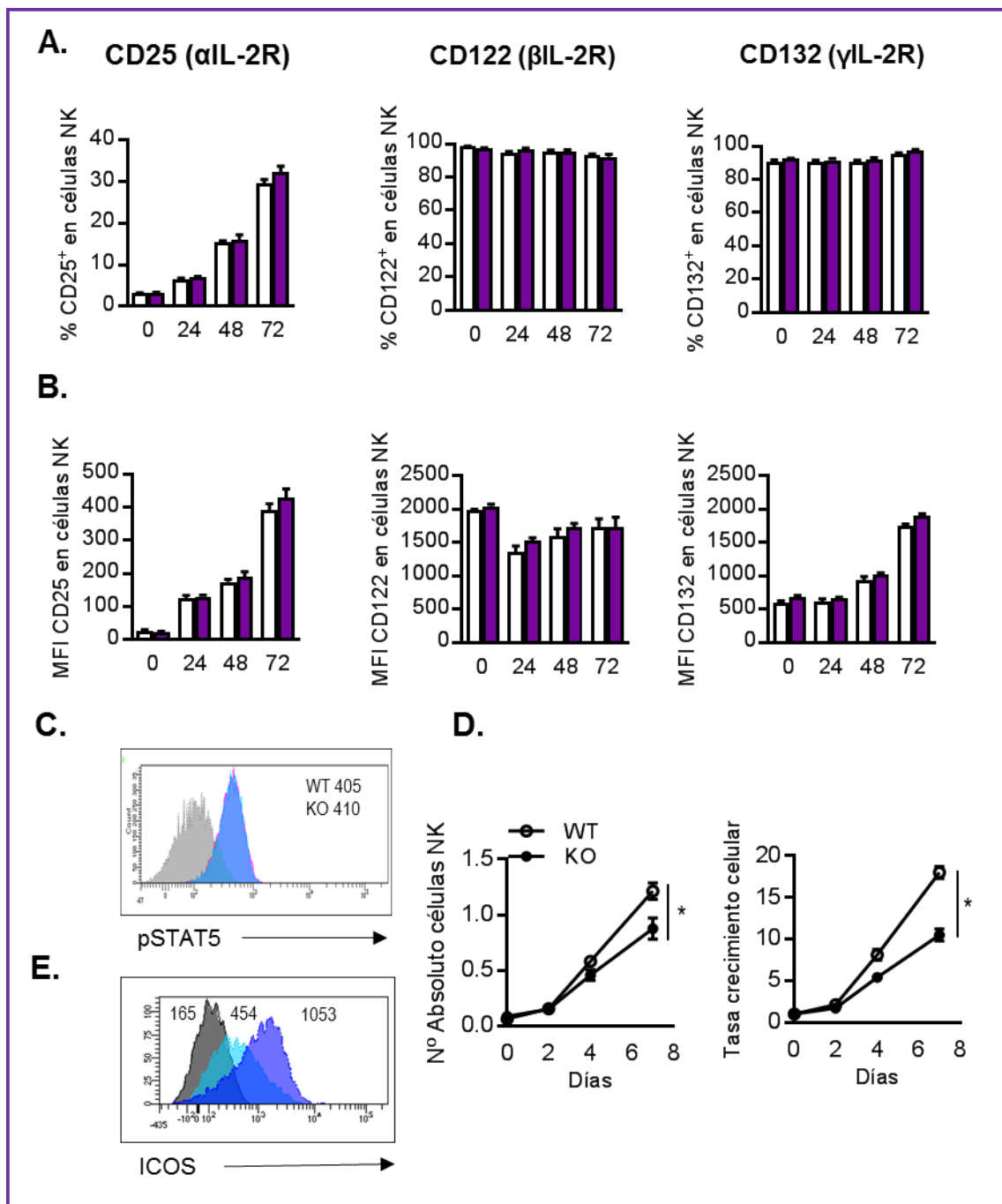
**Figura 12. Células NK de ratones ICOS-KO presentan un incremento de apoptosis.**

Apoptosis espontánea temprana en células de bazo recién obtenidas, medida como porcentaje de células anexina V positivas y ioduro de propidio (IP) negativas en cada una de las subpoblaciones seleccionadas. A la derecha *dot-plots* representativos de 5 experimentos realizados. \* $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) y KO (moradas)

La homeostasis de las células NK y su activación está influida por las interacciones célula-célula y el entorno de citoquinas. Particularmente, citoquinas como la IL-2 juegan un papel importante en diferentes aspectos de la biología de las NK, incluyendo la homeostasis y la función. Además, el primer progenitor NK se caracteriza por la expresión de IL-2R $\beta$  (CD122), un marcador de superficie que se sigue expresando a través de todas las etapas del desarrollo de las células NK (Sitnicka, 2011, Di Santo, 2006). Por ello, nos preguntamos si las diferencias entre células NK ICOS-KO y WT podrían deberse a diferente sensibilidad y nivel de respuesta a la IL-2. Como se muestra en la Figura 13 A, los niveles de expresión de las subunidades del receptor de IL-2,  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122) y  $\gamma$  (CD132), no parecen afectadas en las células NK de ratones ICOS-KO. Las células NK en reposo prácticamente no expresan la subunidad CD25, pero sí las subunidades CD122 y CD132 (Figura 13 B) como se ha descrito por otros autores (revisado en (Boyman and Sprent, 2012)).

El tratamiento con IL-2 produjo un aumento de la expresión de CD25, con un incremento similar en células WT y KO, y tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de CD122 o CD132 (Figura 13 A y B).

Analizamos también la fosforilación de STAT, un intermediario importante en la vía de señalización intracelular activada por la IL-2 (Marcais et al., 2014), sin encontrar diferencias significativas en los niveles de pSTAT-5, al activar las células NK de ratones WT e ICOS-KO con IL-2 (Figura 13 C).



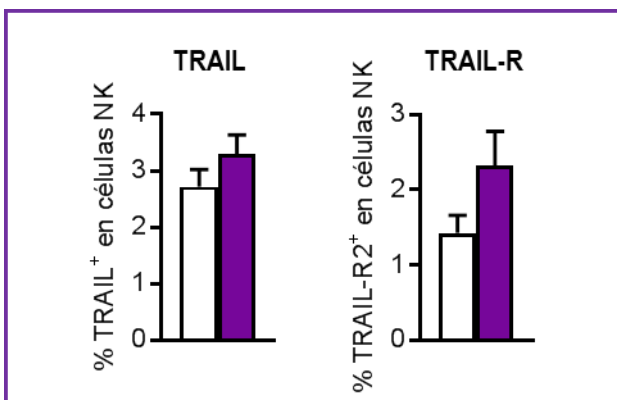
**Figura 13. Los Ratones ICOS-KO no muestran alteración aparente en el receptor de IL-2 y en respuesta a esta citoquina aumentan la expresión de ICOS y proliferan.**

**A.** Porcentajes de expresión de las diferentes cadenas del receptor de la IL-2, en células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) previamente purificadas de bazo de ratones WT e ICOS-KO. **B.** Intensidades de fluorescencia (MFI) de cada uno de los marcadores en las mismas células cultivadas con IL-2 (2000 U/ml) durante los tiempos indicados. Datos de 3 experimentos. Barras: WT (blancas), ICOS-KO (moradas). **C.** Tinción de pSTAT5 en células NK WT y KO purificadas a partir de bazo total y activadas con IL-2 (2000 U/ml) durante 5 días, lavadas y reestimuladas con IL-2 durante 30 min. Gris: control de isotipo. Azul: WT. Rosa: KO. **D.** Curva de proliferación de células NK WT y KO purificadas a partir de bazo total y activadas con IL-2 (2000 U/ml) durante 6 días. **E.** Tinción de ICOS en células NK WT purificadas a partir de bazo total (gris) y activadas con IL-2 (2000 U/ml) durante 48h (azul claro) y 72h (azul oscuro). Se indica MFI de cada pico.

La adición de IL-2 a los cultivos indujo la proliferación de las NK de ratones WT e ICOS-KO. Ambas poblaciones, se multiplicaron en presencia de IL-2 aunque las NK de ICOS-KO lo hicieron con una tasa significativamente menor (Figura 13 D). La adición de IL-2 aumentó la expresión de ICOS en las NK de WT, como se muestra en la Figura 13 E. La presencia de esta citoquina durante 24h no modificó significativamente la diferencia en apoptosis encontrada entre NK de ratones WT e ICOS-KO (no mostrado).

Estos resultados sugieren que la implicación de ICOS en la homeostasis y la supervivencia de las células NK no es debida a una alteración en la respuesta a IL-2, factor clave de supervivencia para estas células.

TRAIL es una molécula implicada en la función citotóxica de las NK, que se expresa en ciertas subpoblaciones NK inmaduras (Takeda et al., 2005, Zamai et al., 1998). La interacción de TRAIL con su receptor puede jugar un papel en la inducción de apoptosis (Falschlehner et al., 2007) y por ello analizamos si podría estar implicada en la mayor apoptosis encontrada en las NK de ratones ICOS-KO. No observamos diferencia significativa en la expresión de TRAIL ni de TRAIL-R2 (Figura 14) en las NK de ratones WT e ICOS-KO. Además el bloqueo de TRAIL con un anticuerpo específico no redujo la apoptosis encontrada en las NK de ICOS-KO (no mostrado).

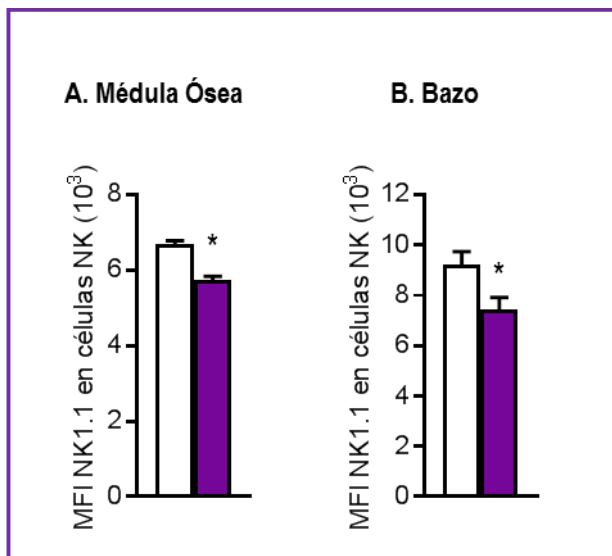


**Figura 14. Las células NK de ICOS-KO no muestran diferencias significativas, con ratones WT, en la expresión de TRAIL y su receptor.**

Porcentajes de células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) de bazo de ratones WT e ICOS-KO que expresan TRAIL y su receptor 2. Datos de 3 experimentos independientes. Barras: WT (blancas) y KO (moradas)

## 6.2 El desarrollo de NK está alterado en ratones ICOS-KO

El proceso de maduración y desarrollo de NK se produce principalmente en la médula ósea, aunque también puede tener lugar en otros órganos, incluido el bazo. El hecho de encontrar valores de NKs alterados en médula ósea de ratones ICOS-KO nos llevó a analizar alteraciones del desarrollo de estas células asociados a esta deficiencia. La expresión gradual de marcadores de membrana como NK1.1, CD11b, o CD27 permite identificar estadios en el proceso de maduración de las NK. De esta forma, observamos que los niveles de expresión de NK1.1 están reducidos en células NK de ratones ICOS-KO, tanto en la médula ósea como en el bazo (Figura 15), lo que indicaría que la deficiencia de ICOS podría estar influyendo de alguna forma en el proceso de maduración de células NK.



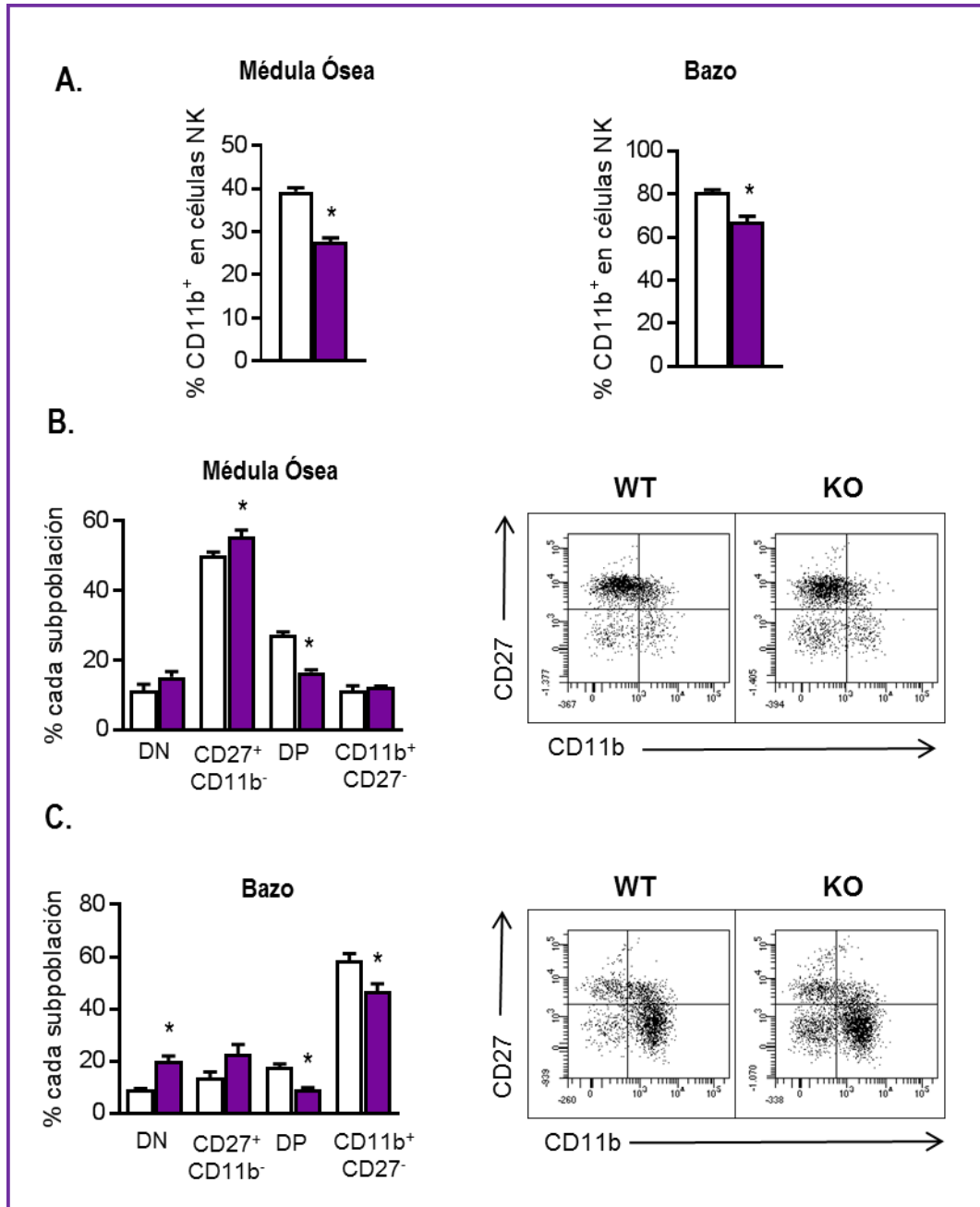
**Figura 15. Disminución de expresión de NK1.1 en NK de ratones ICOS-KO.**

Intensidad de fluorescencia (mediana) de NK1.1 en células linfoides NK (CD3<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>) en médula ósea (A) y bazo (B), de ratones WT e ICOS-KO. Datos de 7 experimentos. \*  $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) y KO (moradas).

La proporción de células NK1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> está significativamente disminuida en las NK de los ratones ICOS-KO tanto en médula ósea como en bazo (Figura 16 A), indicando alteraciones en la maduración de estas células. El análisis conjunto de la expresión de CD11b y CD27 en la población NK CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> permite definir cuatro estadios secuenciales de maduración (Figura 16 B y C). Nuestros resultados muestran que, tanto la médula ósea como el bazo de los ratones ICOS-KO, contienen una mayor proporción de poblaciones inmaduras CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (dobles negativas, DN) y/o CD11b<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>, y una menor proporción de poblaciones maduras CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (doble positivo, DP) y/o CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>; sugiriendo un retraso en la maduración NK (Figura 16 B y C). Como es esperable, la médula ósea mostró una mayor proporción de poblaciones inmaduras comparada con el bazo, y en éste se encontró mayor proporción de poblaciones maduras, pero la tendencia se mantuvo en ambos compartimentos; confirmando un aparente retraso en la maduración de las NK en la médula ósea y en bazo de los ratones ICOS-KO.

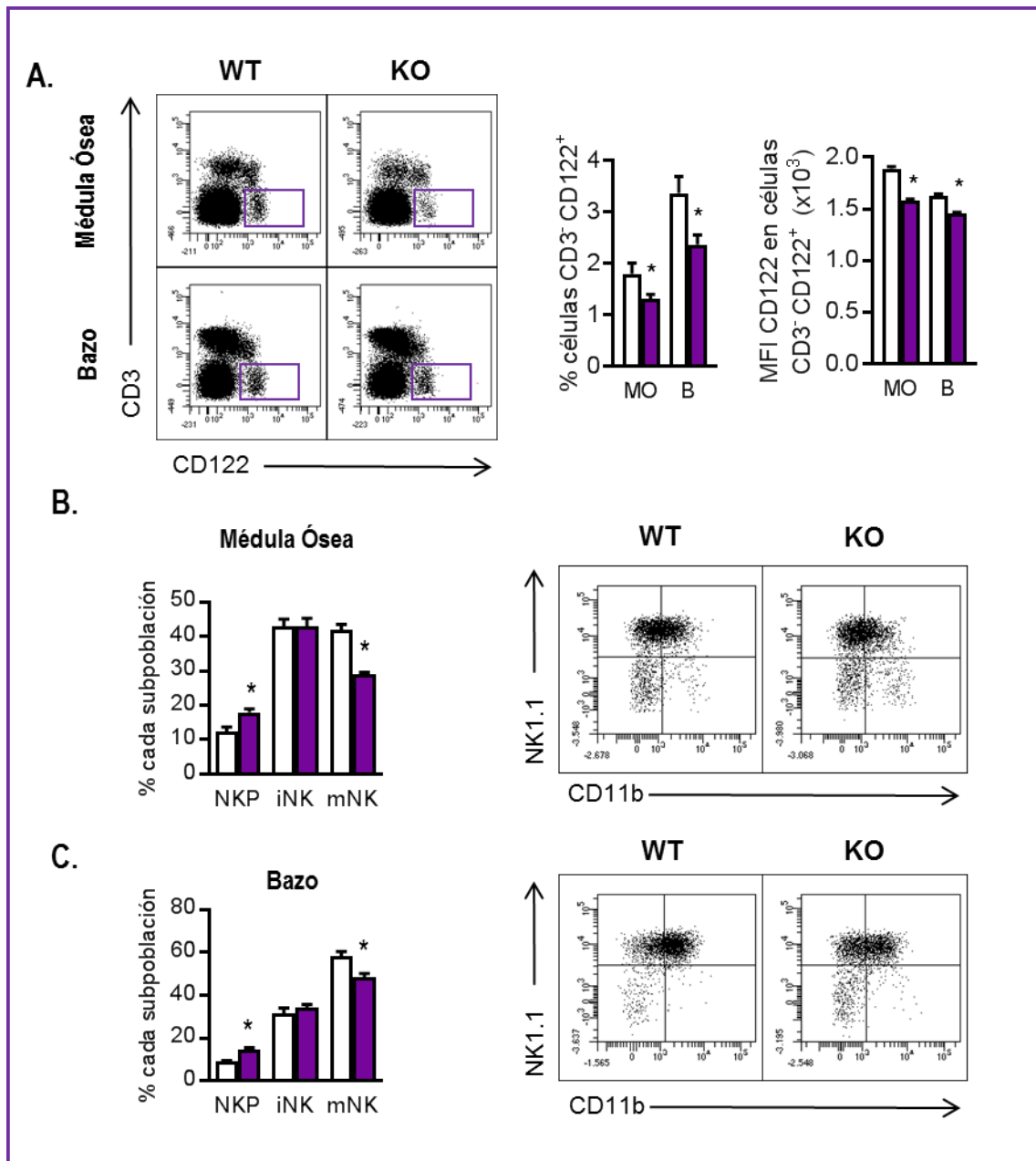
Bajo la premisa de que las células NK ICOS-KO expresan un menor nivel de NK1.1, y sabiendo que los progenitores NK (NKP) por definición no expresan este marcador de linaje NK, sino que vienen definidos por la expresión de la cadena beta del receptor de la IL-2 (CD122) (revisado en (Geiger and Sun, 2016)), utilizamos una aproximación experimental diferente para seguir estudiando la influencia de ICOS en las primeras etapas del desarrollo NK. Así, analizamos poblaciones NK en ratones WT e ICOS-KO definiendo el linaje con base en la expresión de CD122. Encontramos una frecuencia significativamente menor de células CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> en la población linfóide total en la médula ósea y el bazo de ratones ICOS-KO (Figura 17A). Cuando seleccionamos las células de linaje NK en función del marcaje CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> y determinamos la expresión de NK1.1 y CD11b en dicha subpoblación, definimos tres subpoblaciones (Figura 17 B y C): NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> (DN, NKP), NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (iNK, células NK inmaduras) y NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (mNK, células NK maduras) tanto en la médula como en el bazo de ratones. En ambos órganos, se observa una mayor

proporción de NKP y una menor proporción de mNK en ratones ICOS-KO comparados con los WT (Figura 17 B y C).



**Figura 16. Alteraciones en los estados madurativos de las NK CD3-NK1.1<sup>+</sup> de ratones ICOS-KO, definidos por la expresión de CD27 y CD11b.**

**A.** Porcentajes de expresión de CD11b en células NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) de médula ósea y bazo de ratones WT e ICOS-KO. **B y C.** Porcentajes de las distintas subpoblaciones celulares o estados madurativos, basados en la expresión de los marcadores CD27 y CD11b, en células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) de médula ósea (B) y bazo (C) de ratones WT e ICOS-KO. A la derecha, *dot-plots* de los marcajes realizados en un experimento representativo de cinco realizados. \*p<0.05. Barras: WT (blancas) y KO (moradas).



**Figura 17. Alteración de los estados madurativos de células NK CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup> en ratones ICOS-KO.**

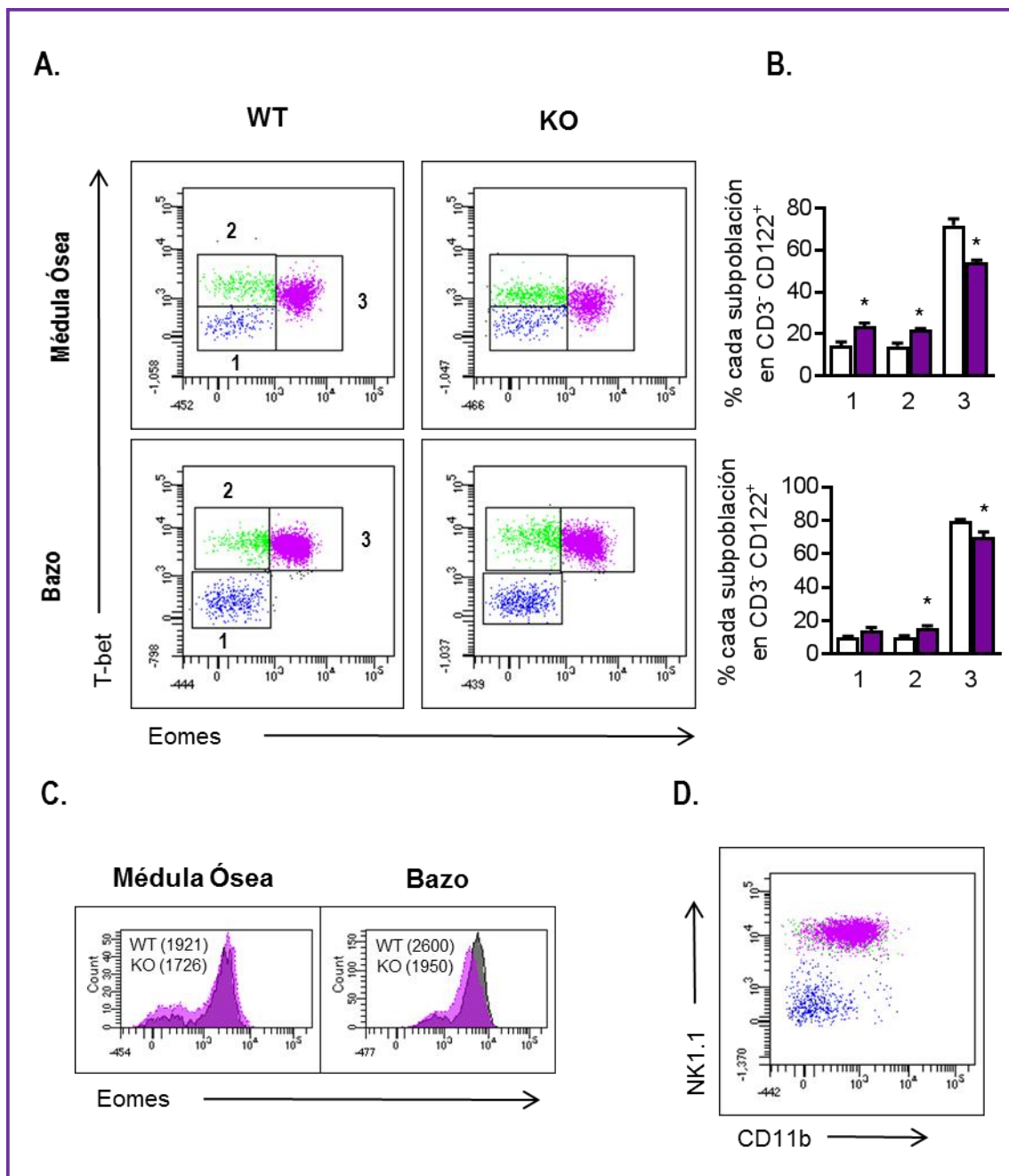
**A.** *Dot-Plots* representativos de la distribución de las células NK seleccionadas como CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup> (izquierda); MFI (derecha) y porcentajes (centro) de células CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup> de la población linfoide de médula ósea y bazo, de ratones WT e ICOS-KO. **B y C.** Izquierda: Porcentajes de los diferentes estadios NK valorados en función de los marcadores NK1.1 y CD11b en células seleccionadas como CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup>, de médula ósea (B) y bazo (C). Derecha: *Dot-plots* representativos de 5 experimentos realizados. NKP (precursores NK), iNK (NK inmaduras), mNK (NK maduras). \*p<0.05 Barras: WT (blancas) y KO (moradas).

### 6.3 Factores de transcripción implicados en desarrollo NK

Como se ha comentado en la introducción, T-bet y Eomesodermina (Eomes) regulan el proceso de maduración de las células NK de una manera coordinada. T-bet se expresa desde etapas muy inmaduras, y es esencial para estabilizar células inmaduras, NK TRAIL<sup>+</sup>. Por otra parte, Eomes se requiere para silenciar la expresión de TRAIL y para completar el proceso de maduración de células NK, adquiriendo éstas diferentes marcadores, como DX5 y el repertorio Ly49 (Gordon et al., 2012).

El estudio de la expresión de estos factores de transcripción en ratones ICOS-KO comparada con la de los ratones WT muestra una disminución de la expresión de Eomes (Figura 18 C) en las NK, seleccionadas como CD3-CD122<sup>+</sup>. Al analizar la coexpresión de ambos factores de transcripción (Figura 18 A) observamos una disminución significativa de las células NK dobles positivas (DP, región seleccionada 3) de médula ósea y bazo de los ratones ICOS-KO. Esta disminución es debida mayoritariamente a un déficit de expresión de Eomes.

En los ratones ICOS-KO están aumentadas las células que no expresan Eomes, pero dentro de estas células se distinguen claramente dos subpoblaciones, una que tiene un nivel de T-bet alto y otra con una expresión de T-bet baja. Fenotípicamente, ambas subpoblaciones se corresponderían con células NK inmaduras, ya que se comprueba que la mayoría no expresan NK1.1 ni CD11b (Figura 18 D).



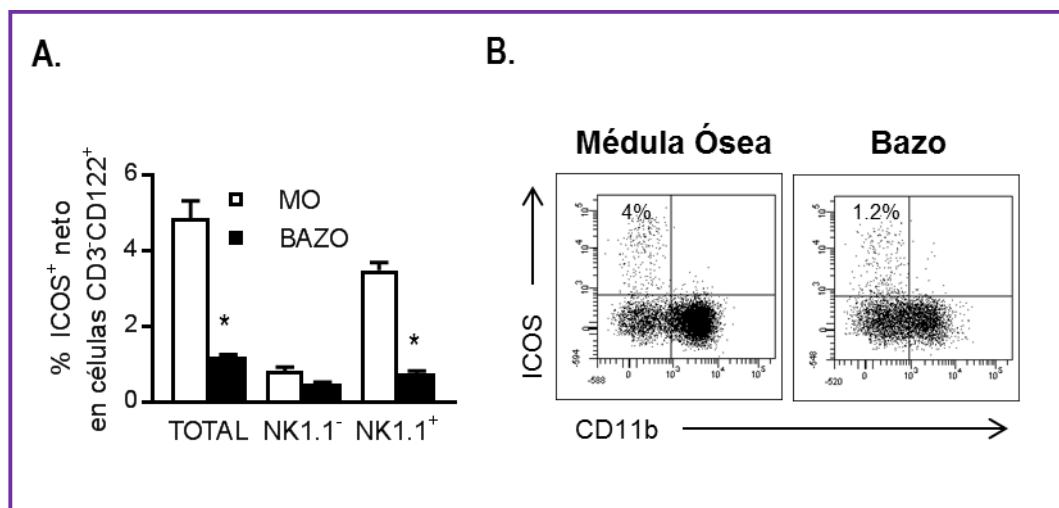
**Figura 18. La expresión de T-bet y Eomes se encuentra alterada en células NK de ratones ICOS-KO.**

**A.** *Dot-plots* representativas de la expresión de T-bet y Eomes en células NK seleccionadas como CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> en médula ósea y bazo de ratones WT e ICOS-KO. **B.** Distribución de las distintas subpoblaciones NK en función de T-bet y Eomes: 1. Eomes<sup>low</sup>T-bet<sup>low</sup> (azul); 2. Eomes<sup>low</sup>T-bet<sup>high</sup> (verde); 3. Eomes<sup>high</sup>T-bet<sup>high</sup> (rosa). Barras blancas, WT; barras moradas, ICOS-KO. **C.** Histogramas que muestran expresión de Eomes en las células CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> en WT (gris) e ICOS-KO (rosa), MFI entre paréntesis. **D.** Valoración del desarrollo NK en función de la expresión de NK1.1/CD11b en las poblaciones mostradas en A (se mantiene la identidad de los colores). Datos procedentes de tres experimentos. \*p < 0.05.



#### 6.4 ICOS se expresa desde los estadios inmaduros de células NK

La expresión de ICOS es muy baja en células NK en reposo, pero aumenta tras la activación por citoquinas u otros estímulos (Ogasawara et al., 2002), como se mostró con el efecto de IL-2 (Figura 13 E). Sin embargo, no hay información disponible sobre los niveles de expresión de ICOS en NK durante su desarrollo en médula ósea o en bazo. Por ello, analizamos la expresión de ICOS en células CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>, población que incluye las NK convencionales desde sus estadios tempranos de maduración, incluyendo los precursores NKP. Nuestros resultados indican que ya en la médula ósea se detecta expresión de ICOS en una proporción, pequeña pero distinguida claramente, de células CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>, incluso antes de que se expresen los marcadores NK1.1 (Figura 19 A) y CD11b (Figura 19 B); es decir, en fases muy tempranas de maduración de la población NK. Los datos representados en la Figura 19 A se refieren a datos netos, sustrayendo el fondo propio de las mismas poblaciones en ratones ICOS-KO. Estos datos, junto con los mostrados anteriormente, sugieren que ICOS puede jugar un papel en la maduración de NKs en la médula ósea y no solo durante los procesos de activación en la periferia. La deficiencia de ICOS podría estar relacionada con la disminución de la expresión de NK1.1 (medido como intensidad de fluorescencia) observada en las NK de ratones ICOS-KO (Figura 15), produciendo un retraso en la maduración y acumulación de estadios tempranos (NKP) y el desequilibrio de maduración de las NK encontrado en los ratones ICOS-KO (Figuras 16 y 17).

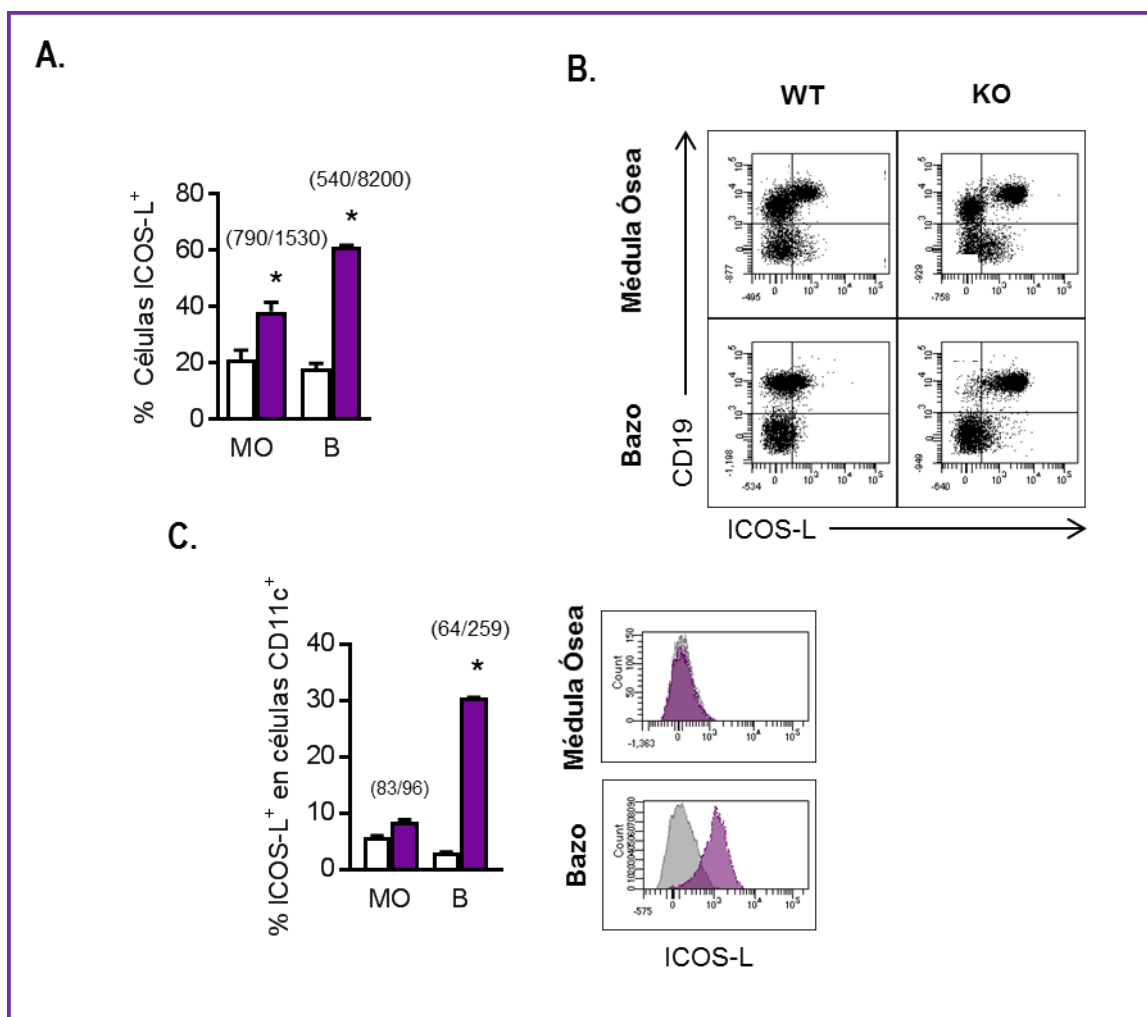


**Figura 19. ICOS se expresa en estadios inmaduros de las células NK.**

**A.** Porcentajes de células CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> que expresan ICOS y son además NK1.1<sup>+</sup> o NK1.1<sup>-</sup>, tanto en médula ósea como en bazo de ratones WT. Barras blancas: Médula ósea; barras negras: Bazo. El porcentaje de células ICOS positivas se ha calculado como neto, restando el fondo que expresaban los ratones ICOS-KO. Datos procedentes de tres experimentos. \*p<0.05. **B.** Dot-plots representativos de la expresión de ICOS y CD11b, en la misma población CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>. El número indica el porcentaje de células en el cuadrante correspondiente.

## 6.5 ICOS controla la expresión de ICOS-ligando

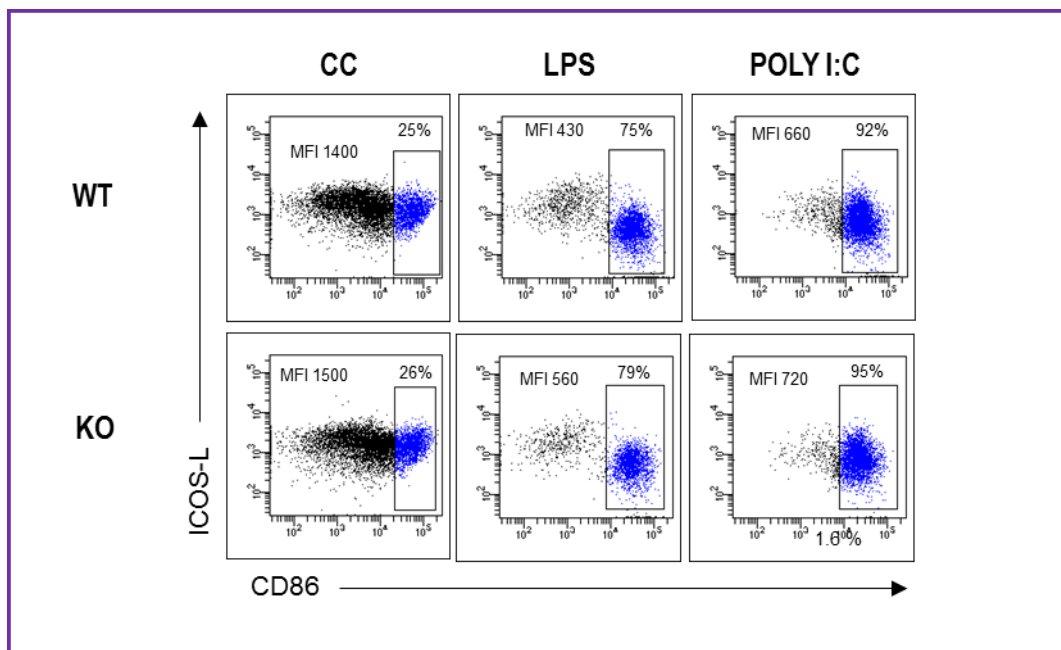
La señalización a través de ICOS está mediada por la interacción con su ligando ICOS-L, formando un par monógamo. Examinamos la expresión de ICOS-L en la médula ósea y el bazo de ratones WT e ICOS-KO, encontrando que, en las células de ratones ICOS-KO, se produce un aumento en la frecuencia de células positivas para ICOS-L, así como un mayor nivel de expresión de dicha molécula (medida como MFI, Figura 20 A). La expresión de ICOS-L está principalmente ligada a células B (CD19<sup>+</sup>, Figura 20 B) y dendríticas (CD11c<sup>+</sup>, Figura 20 C) y está claramente regulada positivamente en ratones ICOS-KO, tanto en células de médula ósea como de bazo (Figura 20).



**Figura 20. La deficiencia de ICOS en los ratones aumenta la expresión de ICOS ligando.**

**A y B.** Porcentajes totales y *dot-plots* representativos de células de médula ósea y bazo que expresan ICOS-L en los ratones WT e ICOS-KO. **C.** Porcentajes e histogramas representativos de la expresión de ICOS-L en células CD11c<sup>+</sup> de médula ósea y bazo de ratones WT e ICOS-KO. \* $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) y KO (moradas). Histograma: WT (gris) y KO (morado)

Llevamos a cabo también el análisis de la expresión de ICOS-L en células dendríticas derivadas a partir de médula ósea (BMDCs), cultivadas con GM-CSF como se describe en Materiales y Métodos, para corroborar la expresión de ICOS-L en esta población y estudiar posibles cambios durante el proceso de maduración de estas células *in vitro* con estímulos como LPS o PolyI:C. En la maduración de las BMDCs se produce un aumento de la expresión de los marcadores típicos de activación CD80 (no mostrado) y CD86 (Figura 21) y una disminución de la expresión de ICOS-L en dicha población, reduciendo claramente su intensidad de fluorescencia en la población activa. En este caso, la disminución de ICOS-L parece independiente de ICOS, ya que se produce tanto en células WT como ICOS-KO.

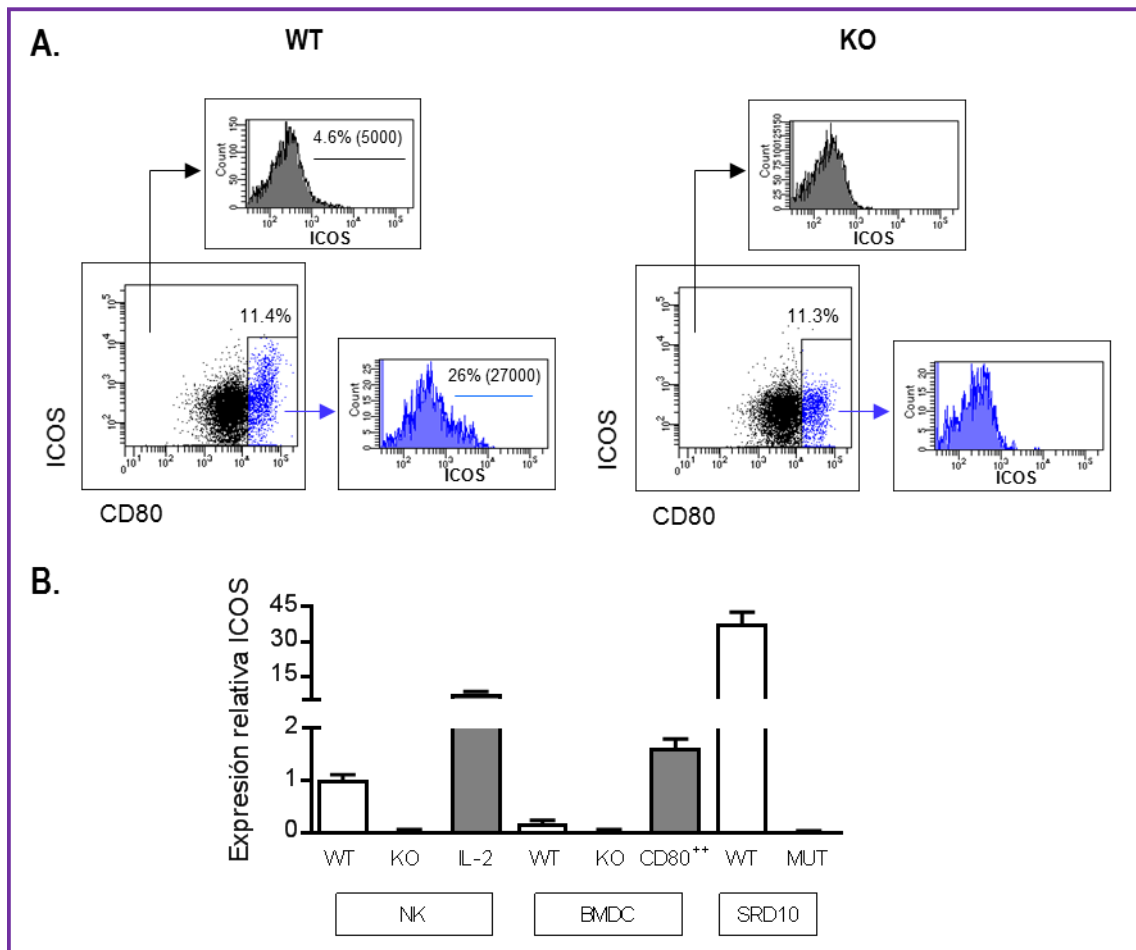


**Figura 21. La BMDCs *down*-regulan la expresión de ICOS-L al madurar.**

*Dot-plots* que muestran la expresión de ICOS-L con respecto a CD86 en BMDCs (CD11c<sup>+</sup>) de 7 días y luego maduras 24h con LPS (100 ng/ml) o PolyI:C (10 ug/ml). Los porcentajes corresponden a la subpoblación CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>++</sup> y las intensidades de fluorescencia indicadas a la MFI de ICOS-L en esa misma subpoblación.

Recientemente se ha descrito que células de linaje mielóide humanas (BMDCs) expresan de modo concomitante el par ICOS/ICOS-L (Hedl et al., 2014), y por ello analizamos esta posibilidad en células de ratón, utilizando métodos citométricos y RT-qPCR. Para ello, se prepararon BMDCs a partir de médula ósea cultivada 7 días en presencia de GM-CSF y se purificaron por *sorting* las células CD11c<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>. Nuestros resultados indican una baja expresión relativa de ICOS cuando se analiza el total de células BMDC CD11c<sup>+</sup> (Figura 22 A, *dot-plot* e histograma en negro). Sin embargo, cuando la población BMDC CD11c<sup>+</sup> es analizada en función de la expresión de CD80 y CD86 mediante *sorting*, observamos una clara expresión de ICOS en la subpoblación BMDC CD11<sup>+</sup>CD80<sup>alto</sup>CD86<sup>alto</sup> (Figura 22 A, *dot-plot* e histograma en azul). En la Figura 22 A se muestra la estrategia de selección de subpoblaciones y la detección de ICOS a nivel de

proteína en las poblaciones seleccionadas, describiendo la expresión de ICOS en BMDCs de ratón. Estos datos fueron corroborados a nivel de RNA mediante ensayos de RT-qPCR (Figura 22 B). Se utilizó la línea SR.D10 (ICOS<sup>+</sup>) y un mutante ICOS<sup>-</sup> de esta línea como control positivo y negativo de la expresión. Los valores están normalizados respecto al gen TBP y relativizados a la expresión de los genes en NK de ratones WT (igual a 1.0).

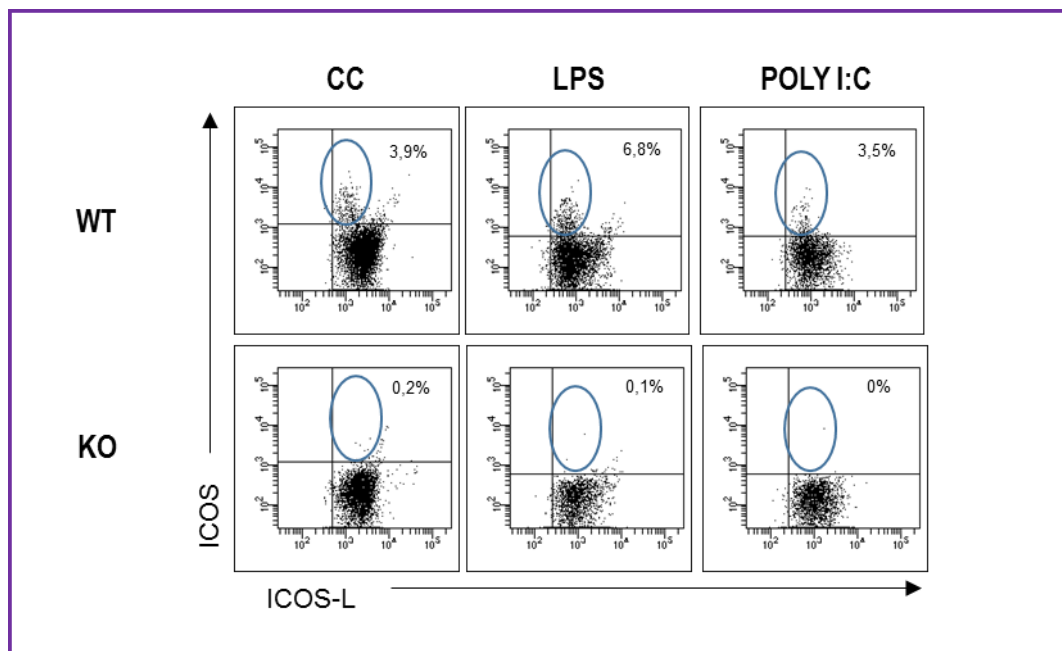


**Figura 22. Las células BMDCs expresan ICOS.**

**A.** Análisis representativo de la expresión de ICOS en BMDCs (células procedentes de médula ósea cultivadas 7 días con GM-CSF), de ratones WT (izquierda) e ICOS-KO (derecha). Expresión en la población total (CD11c<sup>+</sup>) (negro) y en la subpoblación CD80<sup>+</sup> ( azul). **B.** Datos de expresión génica de ICOS analizada mediante RT-qPCR: Células NK CD3-NK1.1<sup>+</sup> (blanco) WT y KO de bazo y cultivadas 6 días con IL-2+IL-12 (gris); BMDC CD11c<sup>+</sup> (WT o KO) o CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>++</sup>CD86<sup>+</sup> (CD80, gris). Células SR.D10, utilizadas como control positivo (WT, blanco), y SR.D10 mutadas como control negativo (mut). Datos de 3 experimentos independientes, empleando como gen normalizador TBP.

Los resultados anteriores nos condujeron a analizar la posible co-expresión del par ICOS/ICOS-L en las BMDCs de ratón. Observamos que una fracción de las BMDCs inmaduras (Figura 23, CC) co-expresan el coestimulador y su ligando. Esta fracción aumenta cuando las células maduran en presencia de LPS, pero no en presencia de PolyI:C; esto añadido al hecho de que el proceso de maduración de las BMDCs supone

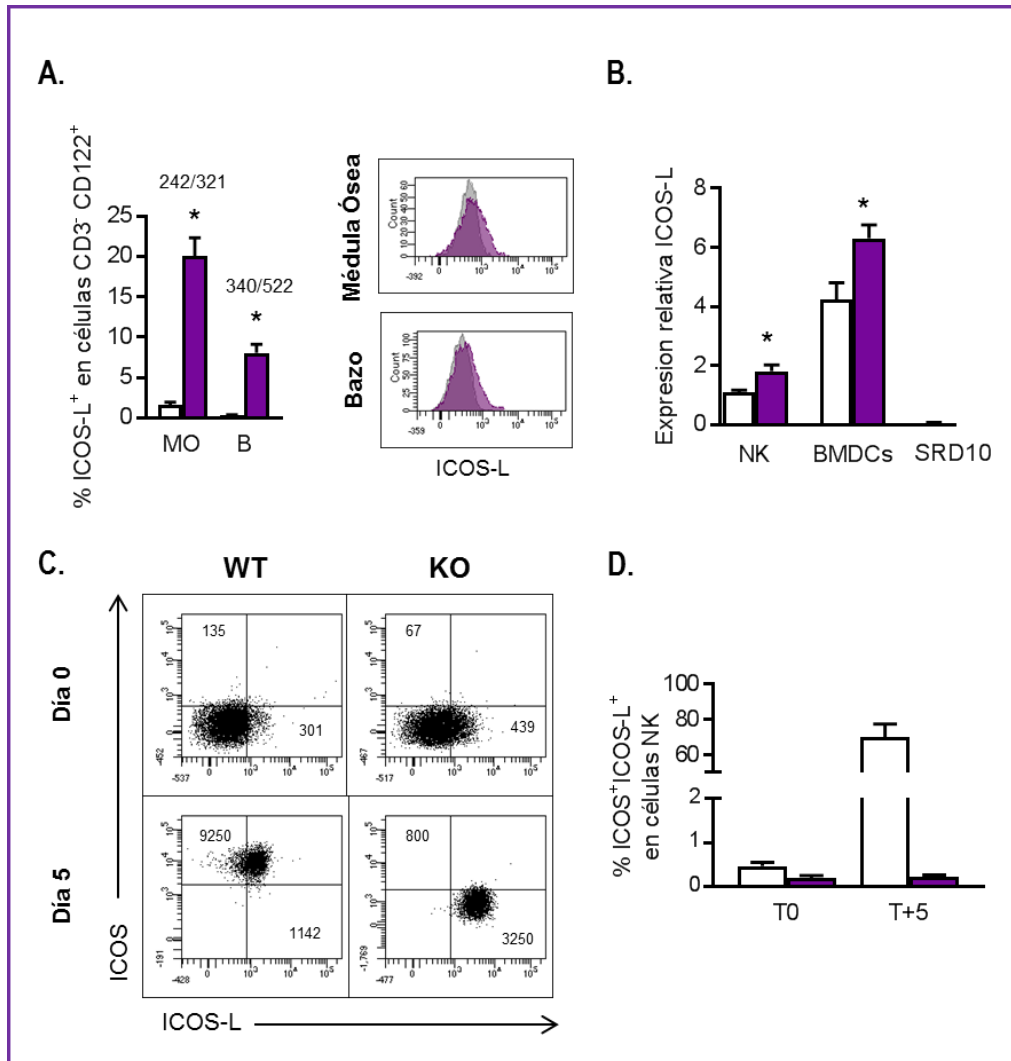
una disminución de la expresión de ICOS-L (Figura 21) sugiere que los estímulos infecciosos pueden modular la expresión de ICOS e ICOS-L en las células dendríticas. Esto da una idea de la complejidad de los mecanismos de regulación de esta vía de señalización/coestimulación en la respuesta inmune, realizando su importancia en múltiples situaciones, tanto fisiológicas como patológicas.



**Figura 23. Las BMDCs coexpresan ICOS-L e ICOS, que aumenta su expresión cuando las DCs, maduran.** *Dot- plots* que muestran la expresión de ICOS e ICOS-L en BMDCs (CD11c<sup>+</sup>) de 7 días y activadas/maduras 24h con LPS (100 ng/ml) o PolyI:C (10 µg/ml). Los porcentajes corresponden a la subpoblación que coexpresa ambas moléculas.

Durante el análisis de la expresión de ICOS-L, observamos que una fracción de las células NK, seleccionadas como CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> también expresan ICOS-L (Figura 24 A), siendo los niveles de ICOS-L mucho más elevados en las NK de ratones ICOS-KO. La expresión de ICOS-L fue también cuantificada a nivel de RNA, mediante RT-qPCR, en células NK purificadas mediante columna magnética y posterior selección de las células CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> por *sorting*. Los resultados (Figura 24 B) mostraron una leve expresión de ICOS-L en NK de ratones WT y un incremento claro en ratones ICOS-KO. Estas diferencias WT versus ICOS-KO se observan también en la expresión relativa de ICOS-L en BMDCs obtenidas a partir de médula ósea, cultivadas 5 días en presencia de GM-CSF y posteriormente purificadas por *sorting* como CD11c<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> (Figura 24 B).

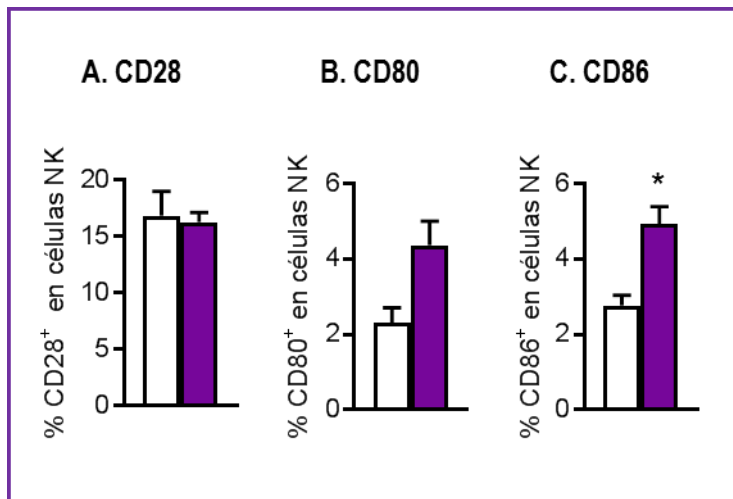
Al detectar ICOS-L en las NK nos propusimos analizar en más profundidad la coexpresión del par ICOS/ICOS-L en la misma subpoblación celular NK. Otras poblaciones linfoides como los linfocitos T o B solo expresan una de estas dos moléculas. La figura 24 C-D muestra la coexpresión de ICOS e ICOS-L en la misma subpoblación NK purificada y activada por IL-2, sugiriendo que la expresión de estas dos moléculas debe de tener una regulación singular en las NK, diferente a la presente en otras células de linaje linfoide.



**Figura 24. Las células NK pueden expresar simultáneamente ICOS e ICOS ligando.**

**A.** Porcentajes e histogramas representativos de la expresión de ICOS-L en células CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup> de médula ósea y bazo de ratones WT e ICOS KO. MFI WT/MFI KO indicada entre paréntesis. **B.** Expresión relativa de ICOS ligando, valorada mediante RT-qPCR, en células NK de bazo seleccionadas por citometría de flujo (CD3-NK1.1<sup>+</sup>) y BMDCs sorteadas (CD11c<sup>+</sup>). La línea celular SR.D10 se utilizó como control negativo de la expresión de ICOS ligando. Datos de 3 experimentos independientes, empleando como gen normalizador TBP y referido a la expresión de ICOS-L en NK WT. Barras: WT (blancas) y KO (moradas). Histograma: WT (gris) y KO (morado). **C.** Dot-plots representativos de la expresión de ICOS e ICOS-L en células NK de bazo purificadas en columna y cultivadas 5 días con IL-2 (2000 U/ml). Se muestran las medianas de la intensidad de fluorescencia. **D.** Porcentajes de co-expresión de las moléculas ICOS e ICOS-L en NKs purificadas de bazo (T0) de ratones WT (barras blancas) e ICOS-KO (barras moradas), y tras cultivarlas 5 días con IL-2 (2000 U/ml, T+5). Datos de 3 experimentos. \*p<0,05.

Estudiando la expresión de otras moléculas coestimuladoras que pertenecen a las mismas familias de CD28 y B7, encontramos que la expresión de CD28 no se encuentra alterada en los ratones ICOS-KO. Sin embargo al analizar los ligandos de CD28 CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), ambos pertenecientes a la misma familia B7 en la que se encuadra ICOS-ligando, observamos un aumento en su expresión en NK de ratones ICOS-KO, aunque se encuentran en un proporción muy baja de células (Figura 25 A ).



**Figura 25. Ratones ICOS-KO y otras moléculas de la familia de B7-CD28.**

Porcentajes de expresión de las moléculas CD28 (A), CD80 (B) y CD86 © en células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) extraídas de bazo de ratones WT e ICOS-KO. Datos de 3 experimentos. Barras: WT (blancas) y KO (moradas). \*p<0,05

## 6.6 Análisis de los marcadores fenotípicos de las NK de ratones ICOS-KO

Durante el desarrollo de las NK va cambiando la expresión de diferentes moléculas de membrana que determinan la adquisición de nuevas funciones y permiten identificar su estado de madurez. Se sabe que el bloqueo de ICOS disminuye la respuesta a infección (Kopf et al., 2000) y que su ausencia hace a los animales más sensibles a encefalomiелitis autoinmune experimental (Dong et al., 2001). La alteración de la relación normal ICOS/ICOS-L produce diversas alteraciones en la respuesta inmune pero se carece de datos sobre su efecto en poblaciones NK *in vivo*. Por todo ello, nos planteamos llevar a cabo un estudio fenotípico y funcional de la población inmune NK en los ratones ICOS-KO.

Después de la adquisición de NK1.1, las células NK inmaduras comienzan a expresar receptores de distintas familias (Figura 2). De entre ellos, seleccionamos algunos para su estudio dentro de la población NK:

**Ly49D** es un receptor activador que pertenece a la familia Ly49, se incluye en la superfamilia de lectinas de tipo C, forma homodímeros que se unen a los aloantígenos del MHC de clase I y su expresión se adquiere desde los estados inmaduros de las NK (Figura 2), siendo importante en el proceso de “educación” de las NK. A diferencia de los miembros inhibidores de la familia Ly49, dotados de un motivo inhibidor ITIM,

Ly49D contiene un motivo citoplasmático activador (ITAM). La expresión de este receptor activador está disminuida en las células NK de los ratones ICOS-KO como se muestra en la Figura 26 A.

**NKG2A** (CD159a o KLRC1) es un receptor inhibidor perteneciente a la familia de NKG2 de receptores lectina de tipo C que se expresan en NK, NKT y en algunas subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los receptores NKG2 reconocen glicoproteínas MHC de clase I no clásicas (HLA-E en humanos y Qa-1 en ratón); algunos miembros de esta familia tienen función activadora y sin embargo, otros son inhibidores de la actividad citotóxica de las células NK, como es el caso de NKG2A. El análisis de su expresión en NK de los ratones ICOS-KO no mostró cambios significativos con los ratones WT (Figura 26 B).

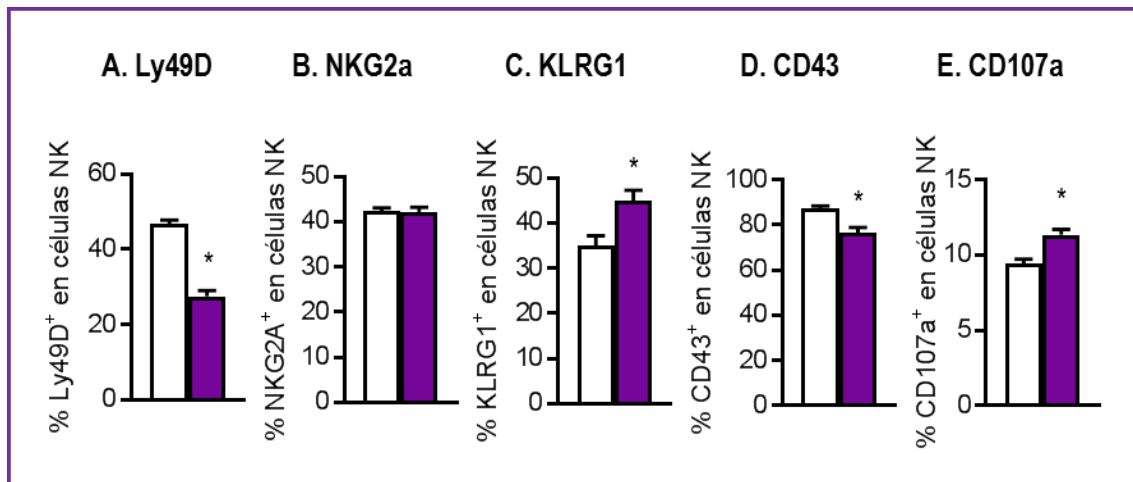
**KLRG1** es un receptor inhibidor, perteneciente a la familia de receptores lectina tipo II, que contiene un motivo citoplásmico similar al ITIM. Inhibe las respuestas inmunes regulando la función efectora y los procesos de desarrollo de las células NK. La adquisición de este marcador define una subpoblación celular con reducidas funciones efectoras, respuesta disminuida a IL-15 y capacidad proliferativa (Huntington et al., 2007). Observamos un aumento significativo en la expresión de este marcador en células NK de bazo de ratones ICOS-KO (Figura 26 C), sugiriendo posibles alteraciones del proceso de maduración o en la activación de las células NK de ratones ICOS-KO.

En una fase posterior del desarrollo se produce la adquisición gradual de las integrinas CD49b (DX5) y CD11b (Mac-1), de las que ya hemos mostrado resultados anteriormente (Figuras 11 C y 16), y CD43, imprimiendo a las NK su carácter maduro.

**CD43** es un marcador de maduración de las células NK, al que se ha atribuido una expresión temporalmente similar a CD11b, por lo que su disminución en las células NK de ICOS-KO (Figura 26 D) puede estar relacionado con el aparente retraso madurativo encontrado. Pero además se ha definido como un posible marcador de poblaciones de memoria inducida por citoquinas (Cerwenka and Lanier, 2016, Kim et al., 2002); por lo que este hallazgo podría también estar relacionado con una posible alteración en la generación de células NK de memoria en los ratones ICOS-KO.

Las células NK también expresan marcadores de actividad citotóxica, como CD107a (**LAMP** o Lysosomal-associated-membrane protein-1,) que es un marcador de degranulación celular (Aktas et al., 2009) que se utiliza para identificar la actividad de las células NK. Las células NK en reposo muestran niveles bajos de expresión de LAMP con un ligero incremento en las NK de los ratones ICOS-KO (Figura 26 E).





**Figura 26. Expresión de receptores activadores e inhibidores de células NK.**

Porcentaje de expresión de varios marcadores Ly49D (A), NKG2a (B), KLRG1 (C), CD43 (D) y CD107a (LAMP, F) en células NK ( $CD3^- NK1.1^+$ ) extraídas de bazo de animales WT e ICOS-KO. Datos de 3 experimentos. Barras: WT (blancas) y KO (moradas). \* $p < 0.05$ .

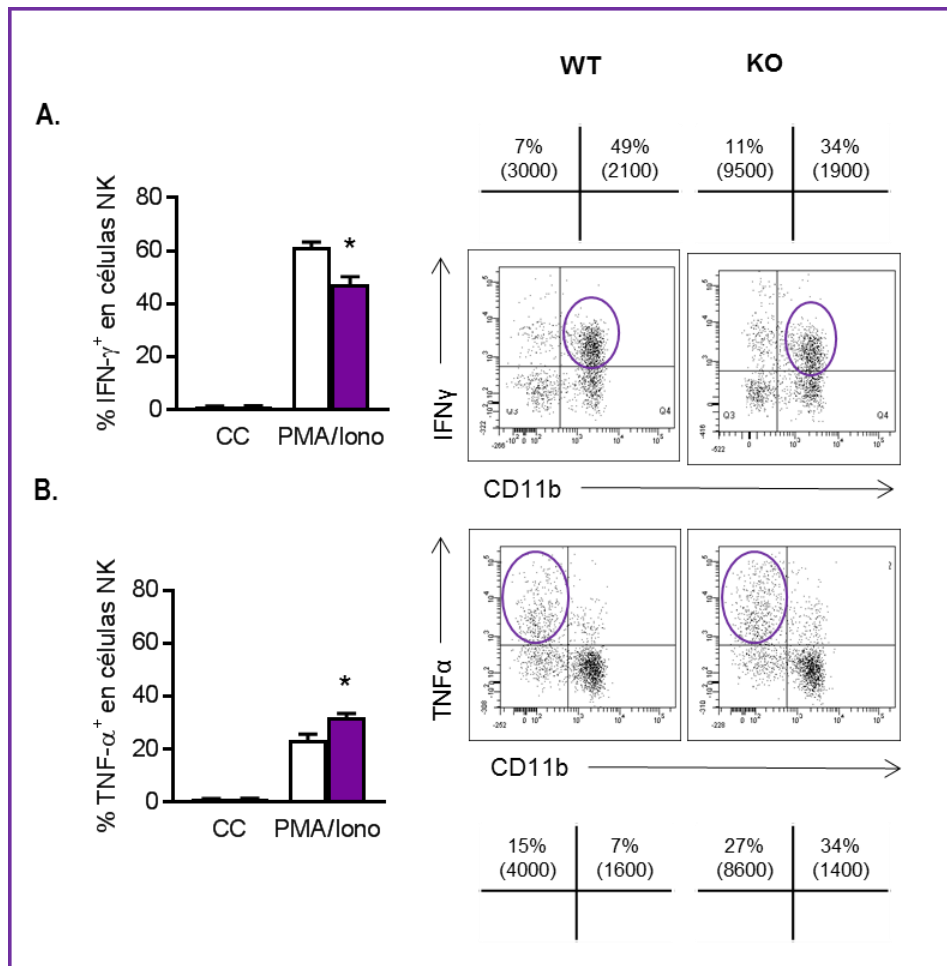
## 6.7 Análisis funcional de las NKs. Implicaciones de la deficiencia de ICOS

La actividad funcional de las NK se basa en la producción de citoquinas (que les permiten relacionarse con otras células) y en la actividad citotóxica frente a células diana (infectadas o tumorales). Hemos llevado a cabo el estudio funcional de las NK de ratones WT e ICOS-KO analizando ambos aspectos.

### 6.7.1 Distintos estadios madurativos tienen diferente capacidad funcional de producción de citoquinas.

IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son dos citoquinas producidas por NK y que tienen gran importancia funcional. Las NK en reposo producen niveles basales muy bajos de estas citoquinas por lo que analizamos la expresión intracelular de estos factores en células NK de bazo de animales WT o ICOS-KO, que fueron estimuladas durante 5h con PMA e Ionomicina, en presencia de brefeldina A. Observamos que la proporción de células productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  es distinta entre estas citoquinas y entre los ratones WT versus ICOS-KO (Figura 27). Estas citoquinas se producen de manera diferente por subpoblaciones NK en diferentes etapas de maduración (Figura 27 *dot-plots*). Basándonos en CD11b como marcador de maduración para subpoblaciones NK observamos que la expresión de IFN- $\gamma$  se detecta claramente en la población madura CD11b $^+$  de ratones WT (Figura 24, *dot-plot* arriba izquierdo); la deficiencia en ICOS produce una disminución en células maduras productoras de IFN- $\gamma$ , con desplazamiento hacia las células inmaduras (Figura 24, *dot-plot* arriba derecho). Sin embargo, TNF- $\alpha$  se detecta preferiblemente en población inmadura CD11b $^-$  en los ratones WT (Figura 24, *dot-plot* abajo izquierdo) y la deficiencia en ICOS produce un aumento de la expresión de esta citoquina especialmente en tanto en células maduras CD11b $^+$  como inmaduras y

esto se refleja no solo en el valor de la fracción de células que expresan TNF- $\alpha$ , sino también en la intensidad de fluorescencia (Figura 24, *dot-plot* abajo derecho). Estos resultados indican que la capacidad funcional en los distintos estadios del desarrollo NK es diferente y puede tener consecuencias en el organismo, como en el caso de los ratones ICOS-KO en los que los estadios inmaduros están incrementados en bazo

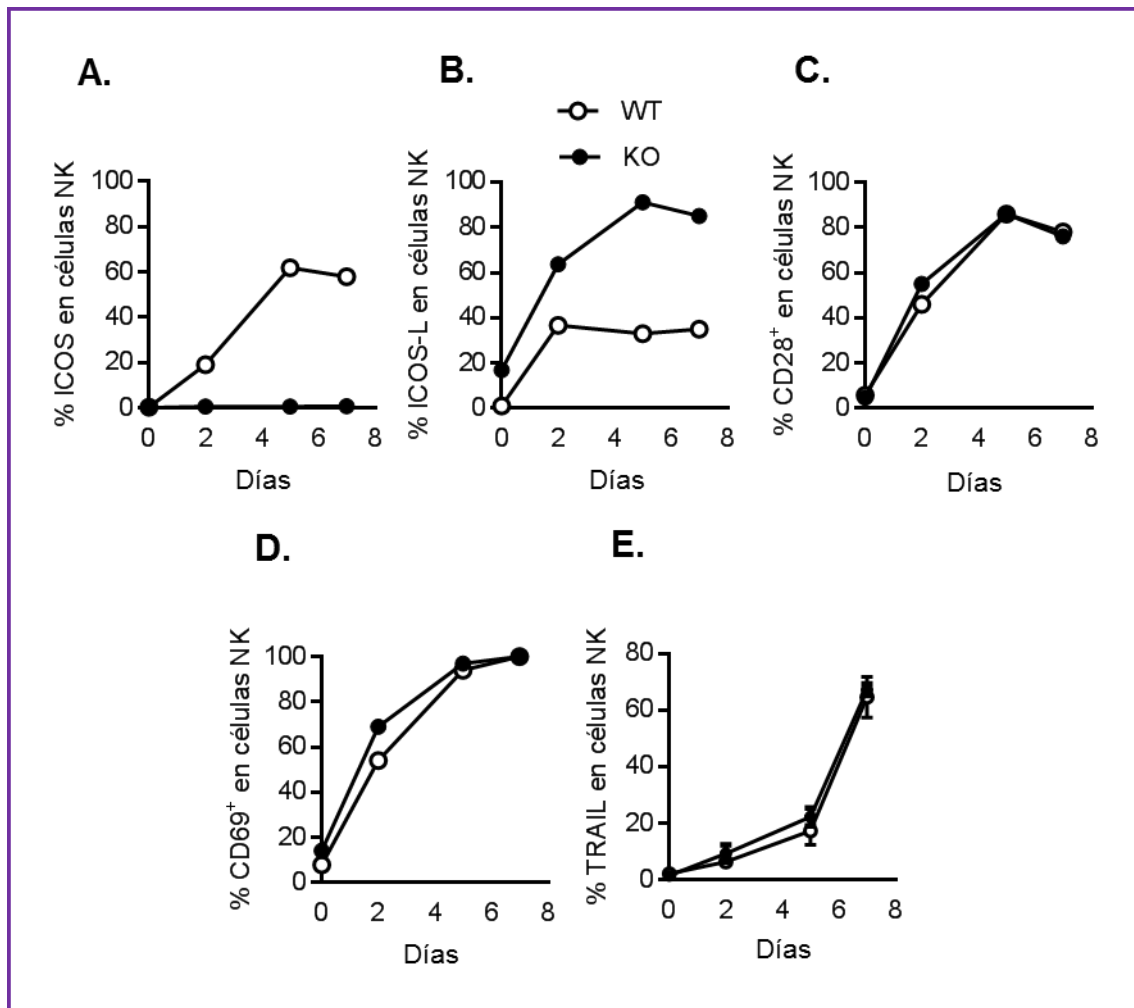


**Figura 27. Las células NK de ratones ICOS-KO presentan alteraciones en la producción de citoquinas.** Se muestra la expresión intracelular de las citoquinas IFN- $\gamma$  (A) y TNF- $\alpha$  (B) en células NK de bazo activadas con PMA/Ionomicina, durante 5 horas en presencia de Brefeldina. Los *dot-plots* muestran un experimento representativo de tres realizados. \* $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) y KO (moradas)

#### 6.7.2 Respuesta funcional de las NK a IL-2

IL-2 es un factor de crecimiento y activación esencial para las NKs. Por ello, hemos utilizado esta citoquina como estímulo para analizar la respuesta funcional de las NK de ratones WT e ICOS-KO. El tratamiento de las NK con IL-2 produce un aumento de expresión de ICOS y de otras moléculas de superficie como ICOS-L, el correceptor CD28 y CD69 (marcador de activación inducible) o TRAIL (Figura 28 A-D).

No se observaron diferencias entre las NK WT y de ratones ICOS-KO en la inducción de CD28, CD69 o TRAIL por IL-2. La activación por esta citoquina produjo un notable incremento de la expresión de ICOS-L en las NK de los ratones ICOS-KO, que partían de un mayor nivel de expresión basal como se demostró en la Figura 24. La presencia de IL-2 también activo la secreción de IFN- $\gamma$  por las NK, datos no mostrados.



**Figura 28. Células NK enriquecidas y cultivadas con IL-2 de ratones ICOS-KO producen más IFN- $\gamma$  *in vitro*.**

Cinéticas de expresión de distintos marcadores (A-D) y de producción de IFN- $\gamma$  en células NK purificadas de bazo de ratones control y posteriormente cultivadas con 2000 U/ml de IL-2 a los tiempos indicados. Símbolos: WT (círculos blancos) KO (círculos negros)

### **PI3K en la respuesta de NK a IL-2**

Las PI3-kinasas juegan un papel importante en la viabilidad celular de distintas poblaciones linfoides (Rojas and Portoles, 2014) y también se les ha adjudicado un importante papel en la activación de las células NK (Gumbleton and Kerr, 2013, Kerr and Colucci, 2011).

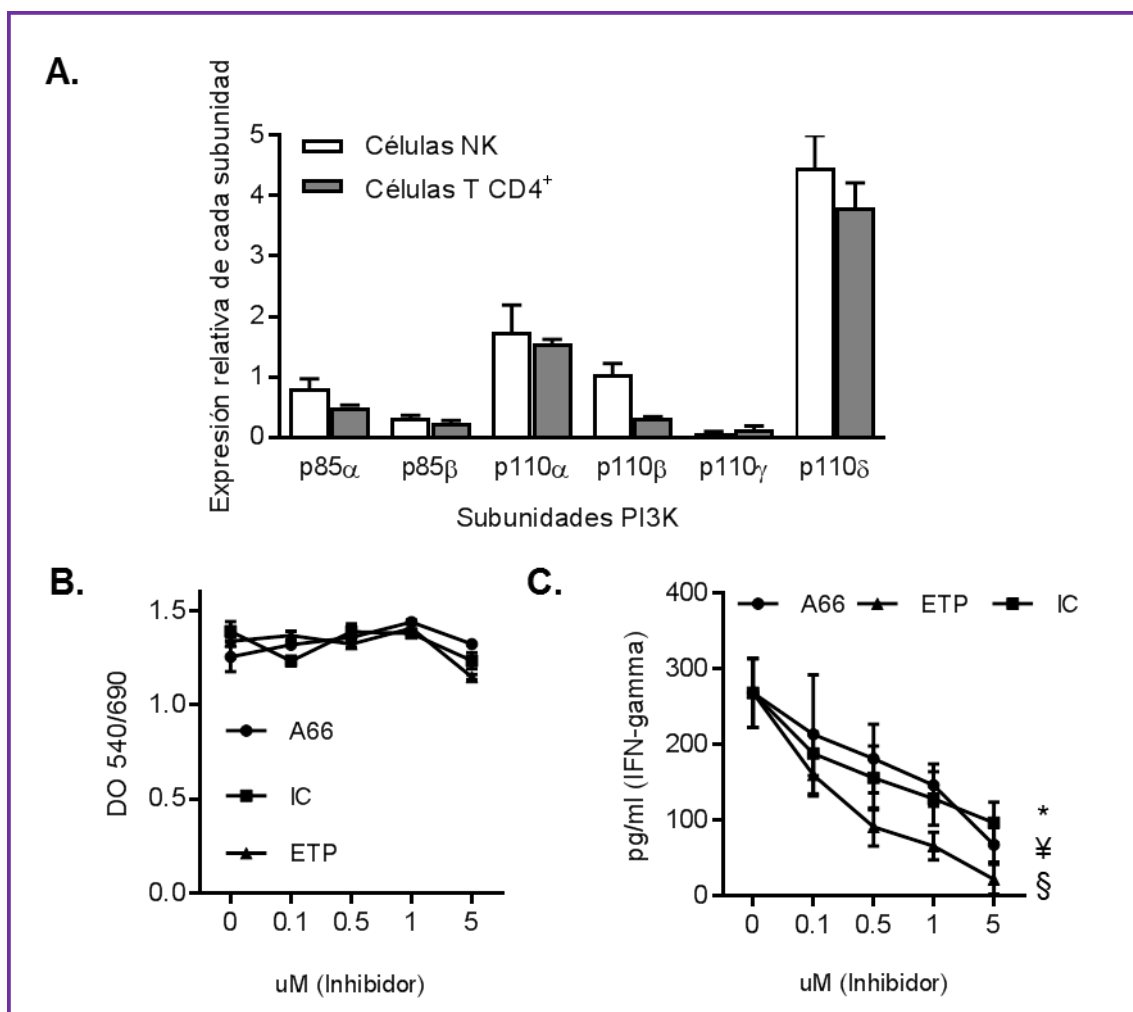
Los niveles de expresión de cada una de las distintas subunidades catalíticas de PI3K de tipo I varía de unas subpoblaciones celulares a otras. Mientras que las subunidades p110 $\alpha$  y  $\beta$  tienen una amplia distribución celular, p110 $\delta$  y  $\gamma$  se expresan principalmente en las células de origen hematopoyético. Los linfocitos T expresan altos niveles de la subunidades delta, pero también expresan la subunidad alfa y esta subunidad es reclutada a la membrana celular cuando ICOS se fosforila (Acosta et al., 2011).

La asociación preferencial de PI3K-p110 $\alpha$  con ICOS, la implicación de este coestimulador en la biología de las NK y la participación de la subunidad p110 $\alpha$  en la funcionalidad de las NK nos han llevado a estudiar algunos aspectos de la enzima PI3K en la activación de células NK por IL-2. Por todo ello nos planteamos analizar los niveles de expresión relativa de varias de estas subunidades catalíticas y reguladoras en las células NK de ratones WT y su implicación funcional. En primer lugar, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de las distintas subunidades mencionadas (Figura 29 A), encontrando que las subunidades p110  $\alpha$  y  $\delta$  son las mayoritarias entre las isoformas de PI3K expresadas por NK, como ocurre también en linfocitos T.

Para estudiar la implicación funcional de las isoformas p110 $\alpha$  y  $\delta$ , realizamos cultivos de NK (purificadas a partir de bazo total y preactivadas durante cuatro días con IL-2), en presencia de IL-2 y diferentes inhibidores específicos de dichas isoformas de PI3K. Utilizamos A66 (un inhibidor de p110 $\alpha$ ), IC87114 (un inhibidor de p110 $\delta$ ) y ETP46321 (un inhibidor dual de p110 $\delta$  y  $\alpha$ ).

Como se observa en la Figura 29, estos inhibidores no alteraron la viabilidad celular (Figura 29 B) pero los tres inhibieron la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK, siendo más efectivo el inhibidor dual de p110 $\alpha$  y  $\delta$ , ETP 46321 (Figura 29 C).

Los resultados obtenidos indican que las señales mediadas, no solo a través de p110 $\delta$  sino también a través de p110 $\alpha$  están implicadas en la producción de IFN- $\gamma$  por NKs en respuesta a IL-2.



**Figura 29. PI3 quinasa en células NK: Efecto de inhibidores específicos.**

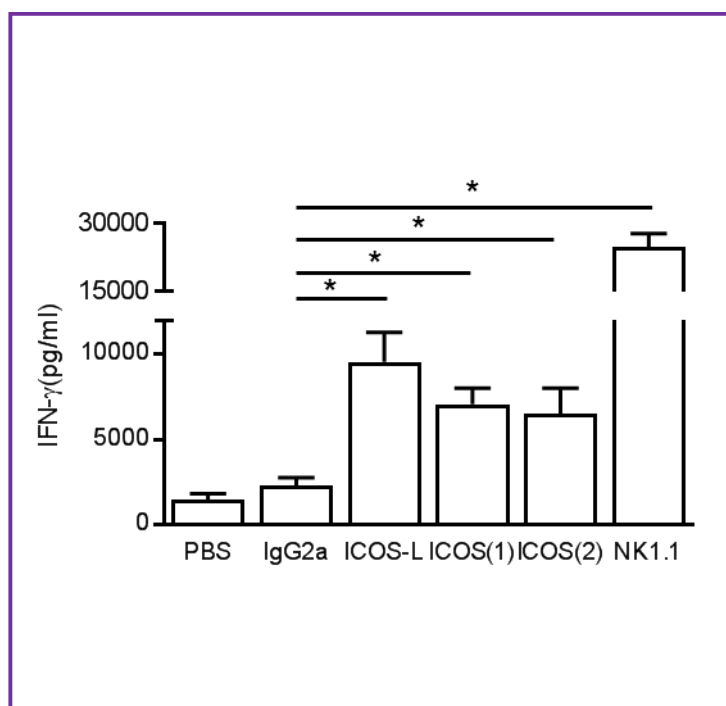
**A.** Datos de expresión génica de varias subunidades de PI3K de distintas subpoblaciones celulares, analizada mediante RT-qPCR. Células NK WT sorteadas (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) a partir de bazo recién extraído (blanco). Células T CD4<sup>+</sup> sorteadas a partir de bazo recién extraído (gris). Datos de 3 experimentos independientes, empleando  $\beta$ -actina como gen normalizador. **B.** Medida de la proliferación/viabilidad celular en presencia de inhibidores de PI3K. **C.** Producción de IFN- $\gamma$  por células NK preactivadas (4 días con IL-2 2000 U/ml) al incubarlas durante 24h con las concentraciones indicadas de los diferentes inhibidores. A66: Inhibidor de p110 $\alpha$ . ETP46321: Inhibidor dual de p110 $\alpha$  y p110 $\delta$ . IC87114: Inhibidor de p110 $\delta$ .

### 6.7.3 ICOS e ICOS ligando juegan un papel en la activación de las células NK.

Hemos descrito la influencia de ICOS en el desarrollo de las células NK y quisimos analizar la influencia de la activación de esta molécula en la capacidad funcional de dichas células. Teniendo en cuenta que las NK en reposo expresan niveles muy bajos de ICOS, empleamos células preactivadas con IL-2 durante 4-6 días, asegurándonos así unos niveles de expresión de ICOS e ICOS-L suficientes para llevar a cabo estimulación *in vitro* en condiciones que permitieran detectar con facilidad el efecto que éstas tienen en la función NK. Para estos ensayos se utilizaron dos tipos de ligandos de ICOS e ICOS-L: Anticuerpos monoclonales

purificados y construcciones recombinantes de ICOS e ICOS-L. En todos los casos, estos reactivos se adsorbieron a placas de cultivo y se valoró la secreción de IFN- $\gamma$  al sobrenadante de cultivo de las NK, al cabo de 24 horas de estimulación por IL-2.

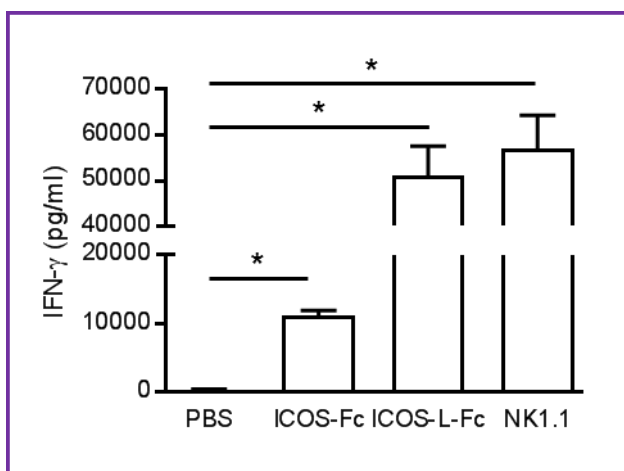
Observamos estimulación de la secreción de IFN- $\gamma$  cuando las NK de ratones WT fueron activadas por anticuerpos que reconocen ICOS (dos anticuerpos diferentes) o ICOS-L (Figura 30). Estos resultados indican que tanto ICOS como su ligando, que se expresa en NKs, son funcionalmente activos en estas células. El reconocimiento de NK1.1 por su Ab específico estimuló notablemente la secreción de la citoquina.



**Figura 30. Células NK producen IFN- $\gamma$  al activarlas con ICOS e ICOS ligando.**

Concentración de IFN- $\gamma$  (ELISA) en sobrenadantes de activaciones en placa (24h) de células NK preactivadas 4 días con IL-2 (2000 U/ml) con distintos anticuerpos: IgG2a (control de isotipo de ICOS ligando), ICOS-L (clon HK5.3), ICOS (1) (clon C398.4A), e ICOS (2) (clon 7E.17G9) se usaron a 10  $\mu$ g/ml, NK1.1 (clon PK136) se usó a 1  $\mu$ g/ml. Previamente a la activación, las células se bloquearon con NMIg durante 30 min 4°C para eliminar inespecificidades.

En otro tipo de ensayo activamos, en presencia de IL-2, células NK con construcciones quiméricas recombinantes formadas por los dominios extracelulares de ICOS (Glu21-Leu142) o ICOS-L (Glu47-Lys279) de ratón fusionados al fragmento Fc de la IgG1 humana (Pro100-Lys330). Estas construcciones se unirán a sus ligandos naturales sobre las células NK. ICOS-Fc se unirá a ICOS-L produciendo un efecto sobre la vía de señalización derivada de esta molécula; ICOS-L-Fc se unirá a ICOS produciendo un efecto en las células NK a través de este coestimulador. En la Figura 31 se observa que la activación a través de ICOS (mediada por la unión a ICOS-L-Fc) produce gran cantidad de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK y es más eficaz que la estimulación de ICOS-L (mediada por ICOS-Fc) en este sistema. Esta diferencia en la activación por Ab monoclonal o por construcción recombinante puede ser debida a la diferente afinidad del reactivo por su ligando o al reconocimiento de distintos epitopos y la consecuente activación de distintas vías de señalización intracelular.



**Figura 31. Células NK producen IFN- $\gamma$  al activarlas con construcciones quiméricas de ICOS e ICOS ligando.**

Concentración de IFN- $\gamma$  (ELISA) en sobrenadantes de activaciones en placa (24h) de células NK (preactivadas 6 días con IL-2, 2000 U/ml) con las distintas construcciones: ICOS- Fc e ICOS ligando-Fc se usaron a 10  $\mu$ g/ml y anti- NK1.1 (clon PK136) se usó a 1  $\mu$ g/ml, como control positivo. Previamente a la activación, las células se bloquearon con NMIg durante 30 min 4°C para eliminar activaciones inespecíficas.

### Señalización intracelular tras activación de las células NK

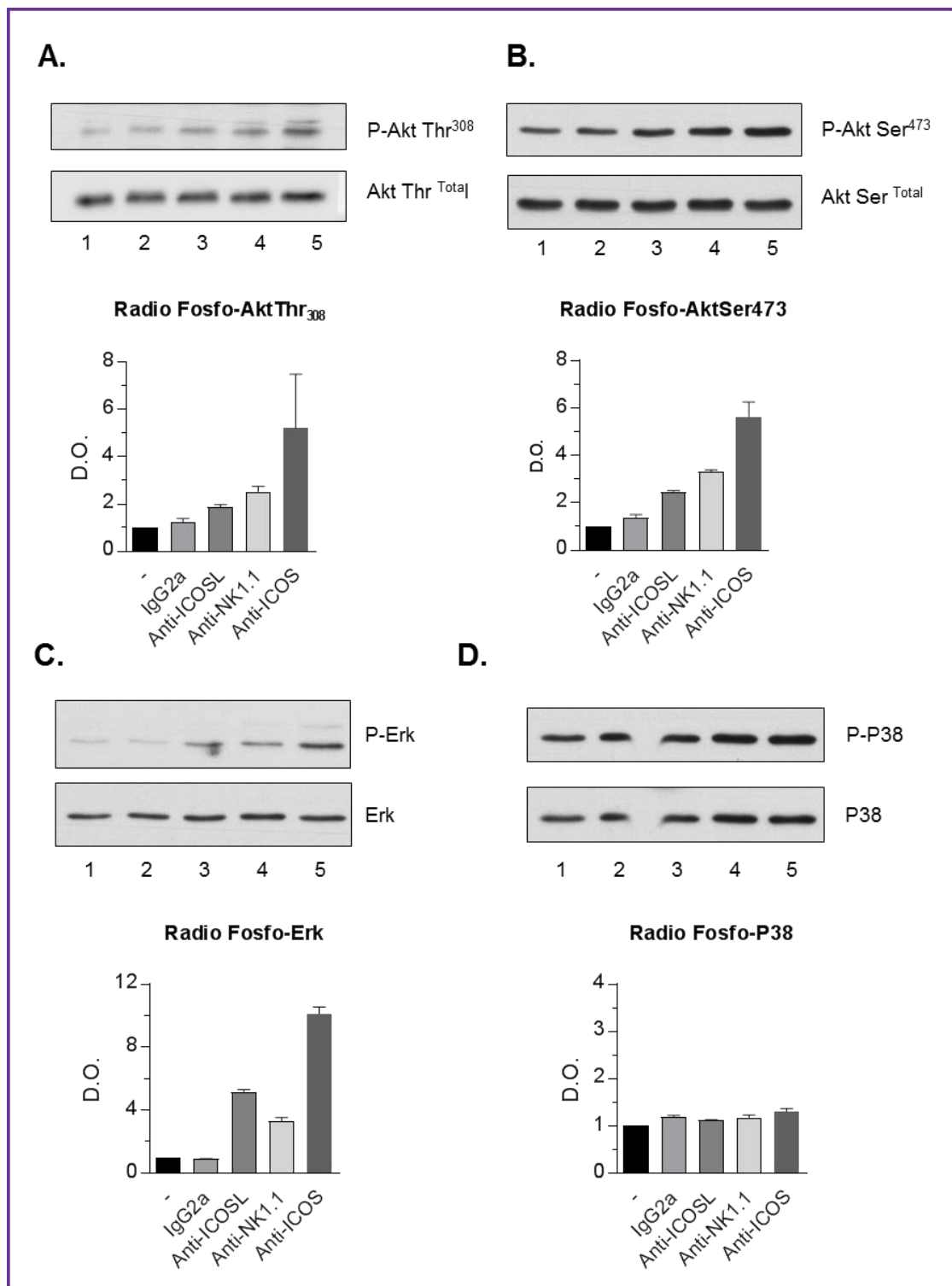
Las señales intracelulares tempranas mediadas por coestimuladores de membrana han sido muy poco estudiadas en células NK. Para llevar a cabo este análisis, realizamos experimentos de activación celular a tiempos cortos con anticuerpos monoclonales anti-ICOS o anti-ICOS-L acoplados a bolas de látex. Al tiempo indicado, se lisaron las células y se analizaron los mediadores intracelulares mediante SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpos específicos.

Se emplearon células NK preactivadas 5 días con IL-2 (2000 U/ml) para asegurar niveles de ICOS e ICOS-L suficientes; los anticuerpos anti-NK1.1 (control positivo), anti-ICOS-L (clon HK5.3) y anti-ICOS (clon C398.4A) y los correspondientes controles negativos, se utilizaron a 5 $\mu$ g/ml.

Mediante *immunoblot* y posterior cuantificación densitométrica de las bandas, se analizó la fosforilación de AKT en Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup>, como una importante quinasa efectora de la vía de PI3K, y las MAP quinases ERK y p38. Los datos se normalizaron respecto a los niveles de las proteínas correspondientes sin fosforilar y se relativizaron al valor control sin coestímulo (sin Ab). Se incluyó también como control la activación en presencia de un Ab IgG2a control.

Tanto la activación a través de ICOS como de ICOS-L provocan una fosforilación de AKT (Figura 32 A y B) y ERK (Figura 32 C), mayor en el caso ICOS, no detectándose activación en p38 (Figura 32 D).

El hecho de que la activación de las NK por parte de ambas moléculas, ICOS e ICOS- L, produzcan una activación de la vía de AKT y ERK, resulta de interés y relevancia en la fisiología de esta subpoblación celular, y confirma a nivel temprano la activación observada en la producción de IFN- $\gamma$  a tiempo más largo.



**Figura 32. La activación en NK mediante ICOS e ICOS-L fosforila Akt y Erk.**

Análisis mediante *immunoblot* de la expresión de las fosfoproteínas Akt (A y B), Erk (C) y P38 (D) en lisados de células NK WT preactivadas durante 5 días con IL-2 (2000 U/ML) y posteriormente activadas durante 30 minutos con los distintos coestímulos indicados en presencia de IL-2 (500 U/ml). 1. Sin Ab. 2. control IgG2a. 3. anti ICOS-L. 4. anti-NK1.1. 5. anti-ICOS. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 5 µg/ml.



#### 6.7.4 Interacción entre células NK y células dendríticas.

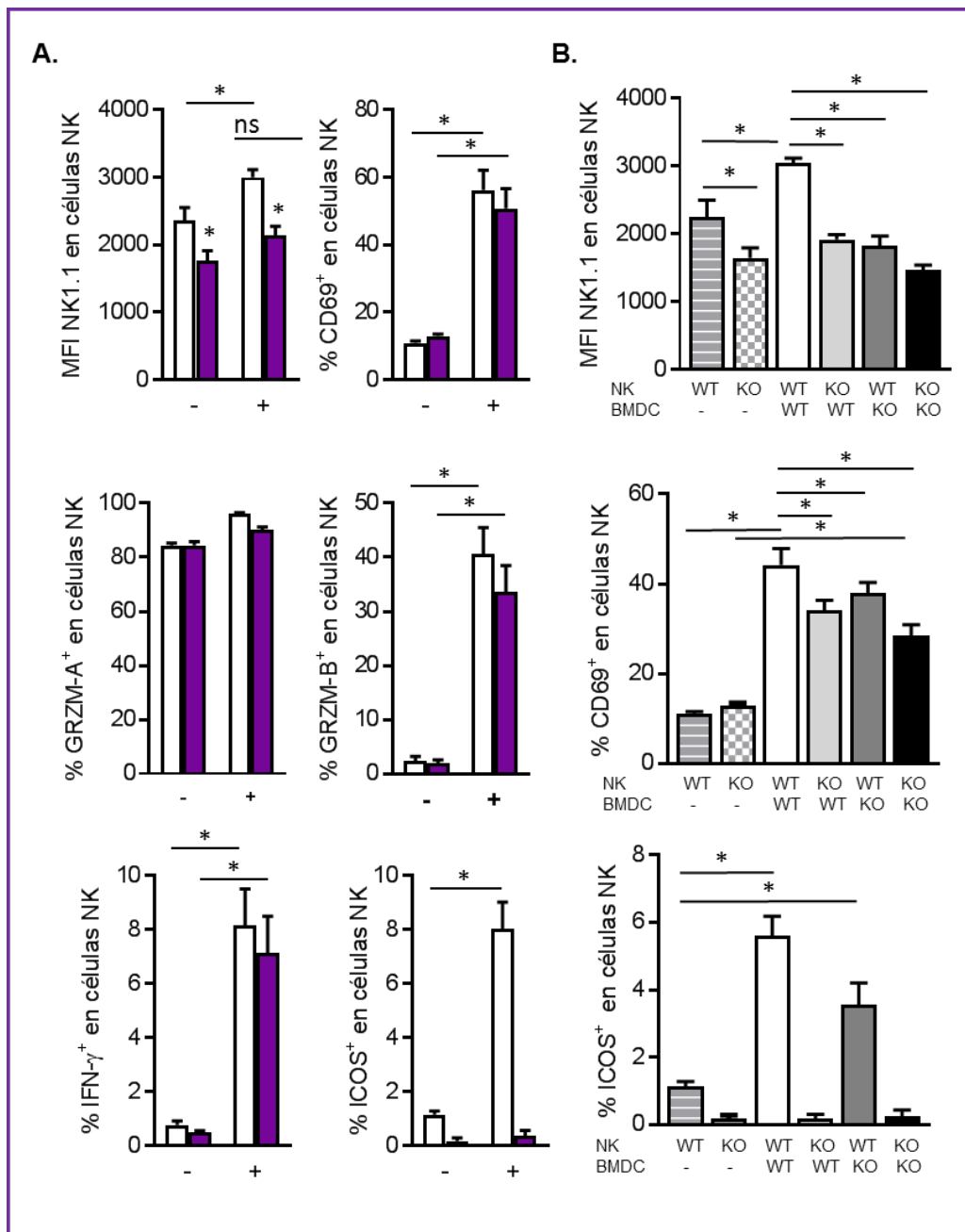
La interacción de las células NK con otras subpoblaciones celulares, en particular con DCs, es de gran importancia para la biología de las NK y para las etapas tempranas de la respuesta inmune. La ausencia de ICOS en ambas subpoblaciones, y la sobreexpresión de ICOS-L en ratones ICOS-KO podrían alterar la relación NK-DC. Por ello, llevamos a cabo ensayos *in vitro* de co-cultivo de células NK purificadas con BMDCs, valorando al cabo de 24 horas la respuesta de las NK en función de cambios en sus marcadores.

Observamos que el co-cultivo de las células NK con BMDCs inmaduras (Figura 33 A) producía una activación de las NK manifestada por el aumento de la expresión de marcadores de activación y función como NK1.1, CD69, IFN- $\gamma$  y granzima B, siendo inferior en las células NK de ratones ICOS-KO. También se observa que la presencia de estas BMDCs durante 24 horas en el co-cultivo estimula fuertemente la expresión de ICOS en las NK de los ratones WT (Figura 33 A, abajo).

Recientemente se ha descrito que la interacción ICOS:ICOS-L produce señales sobre las DC portadoras de ICOS-L generando señales que perfilan la respuesta efectora (Tang et al., 2009, Occhipinti et al., 2013). Para analizar mejor la participación del binomio ICOS:ICOS-L de cada tipo celular NK o BMDC en estos ensayos, llevamos a cabo co-cultivos en los que cada tipo de NK (de ratones WT o ICOS-KO) fueron combinados con BMDCs inmaduras procedentes de ratones WT o ICOS-KO, valorando la respuesta de las NK a las 24 horas (Figura 33 B). Observamos que no solo el fenotipo de la célula NK influye en su propia capacidad de activación, sino que el fenotipo WT o ICOS-KO de las BMDCs inmaduras es determinante en la respuesta de las células NK. De esta forma se produce una disminución progresiva de la expresión de NK1.1 o CD69, siendo óptima en el caso de NK-WT co-cultivada con BMDCs-WT y mínima en el caso NK-KO con BMDCs-KO. Las BMDCs inmaduras de ratones ICOS-KO consiguieron una activación deficiente de las NK-WT (barras gris oscuro) a pesar de que en dichos cultivos se estaría produciendo una interacción heterotípica ICOS:ICOS-L entre NK-WT y BMDC-ICOS-KO. Esto indica que, no solo la expresión de ICOS en las NK, sino también la expresión de ICOS en las BMDCs inmaduras juegan un papel importante en los procesos de activación de las células NK. De hecho las BMDCs inmaduras de ratones ICOS-KO consiguieron una menor expresión, aunque no significativa, de ICOS en las NK de ratones WT (Figura 33 B, panel inferior).

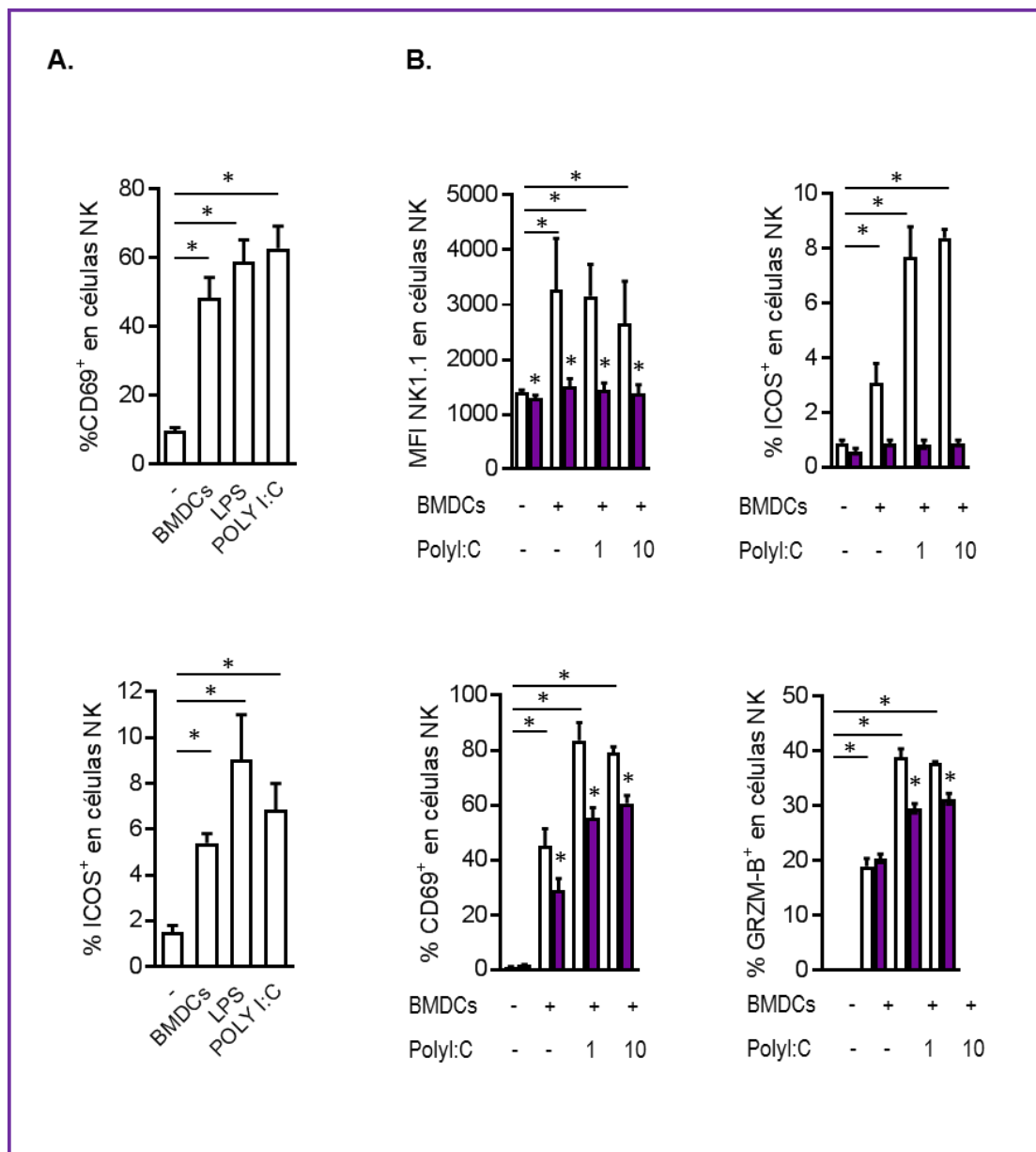
Para analizar el efecto de BMDCs maduras, se realizaron co-cultivos similares pero en presencia de LPS o PolyI:C, estímulos que maduran las BMDCs. Observamos (Figura 34 A) que las BMDCs-WT maduras tienen mayor capacidad de activación de las NK que las BMDCs inmaduras. Al realizar co-cultivos WT:WT y KO:KO en presencia de estímulos de maduración como el PolyI:C, observamos que se mantiene la respuesta deficiente de los co-cultivos que carecen de ICOS tanto en NKs como en BMDCs (Figura 34 B). Esto asigna un papel a la relación compleja de ICOS e ICOS-L presente en ambos tipos celulares y resalta

el posible papel de esta vía en respuestas *in vivo*, ya que las células NK-ICOS-KO responden de un modo deficiente a un estímulo que mimetiza infecciones virales como el PolyI:C, y de gran controversia en cuanto a su papel de activación directa o indirecta sobre las células NK.



**Figura 33. Las BMDCs participan en la homeostais y activación NK**

**A.** Co-cultivo de células NK purificadas de bazo de ratones WT e ICOS-KO en presencia (+) y ausencia (-) de BMDCs WT inmaduras durante 24h. Se valoró la expresión mediante citometría de flujo de distintas moléculas en las NK: NK1.1, CD69, Granzimas A y B, IFN- $\gamma$  e ICOS. \* $p < 0.05$ . Barras: NK WT (blancas) y NK KO (moradas). **B.** Co-cultivo de células NK purificadas de bazo de ratones WT e ICOS-KO en presencia o no de BMDCs WT e ICOS-KO durante 24 horas. Se valoró la expresión de NK1.1, CD69 e ICOS en NK. NK WT sola (rayado horizontal); NK KO sola (cuadros); NK WT:BMDC WT (blanco); NK KO:BMDC WT (gris claro); NK WT:BMDC KO (gris oscuro) y NK KO:BMDC KO (negro). \* $p < 0.05$ .



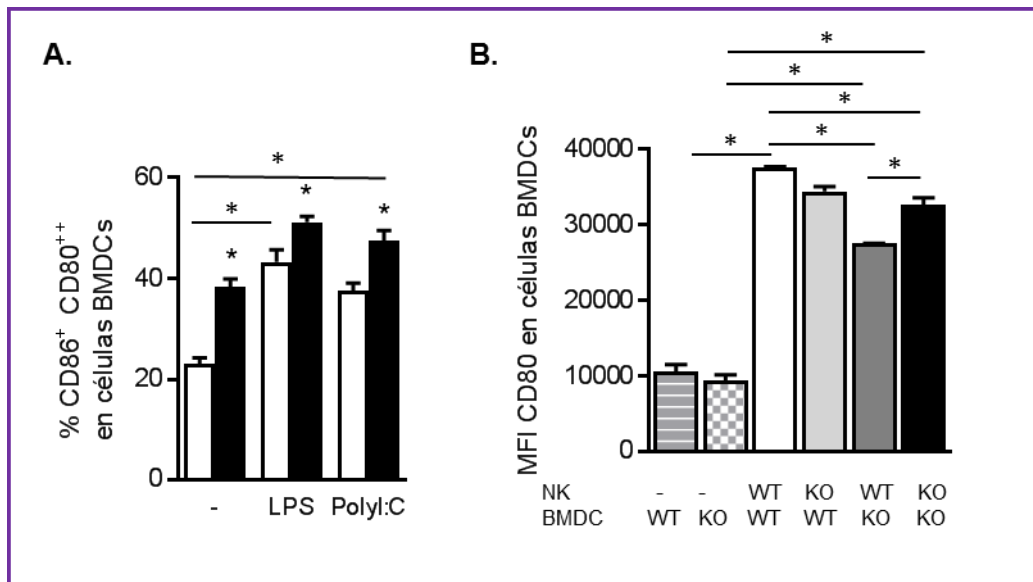
**Figura 34. La maduración de las BMDCs incrementa la activación de las NK: Deficiencias en ratones ICOS-KO**

**A.** Co-cultivo de células NK purificadas de bazo de ratones WT en presencia de BMDCs WT inmaduras y estímulos para su maduración (LPS y PolyI:C) durante 24h. Se valoró la expresión de CD69 e ICOS. \*p<0.05.

**B.** Co-cultivo de células NK purificadas de bazo de ratones WT en presencia de BMDCs, ambas WT (blanco) o ambas ICOS-KO (morado), en presencia o ausencia de PolyI:C como se indica en la figura, durante 24h. Se valoró la expresión de NK1.1, ICOS, CD69 y Granzima B. \*p<0.05. Se indica significación entre barras adyacentes y entre las conectadas con guion.

Puesto que la señalización de ICOS-L puede producir cambios en las BMDCs (Tang 2009) y la relación NK-DC es biunívoca, completamos este estudio analizando el efecto del co-cultivo NK-BMDC sobre estas últimas. De esta forma, observamos que la presencia de NK en el co-cultivo produce un incremento de la expresión de CD80/CD86 en las BMDCs inmaduras y también en las maduras (en presencia de LPS o Polyl:C) (Figura 35 A).

La presencia de NK WT en el co-cultivo estimulo la expresión de CD80 en las BMDCs inmaduras (Figura 35 B), tanto de ratones WT como ICOS-KO, pero con mayor efecto sobre las BMDCs WT. Esto indica que se necesita la presencia de ICOS en ambas células NK y BMDC para conseguir una activación óptima de ambas. Por tanto, la deficiencia en ICOS en las DC de los ratones ICOS-KO podría justificar, al menos en parte, los defectos encontrados en la homeostasis de las NK de dichos ratones.



**Figura 35. Las NKs participan en la activación de las BMDCs: Papel de ICOS**

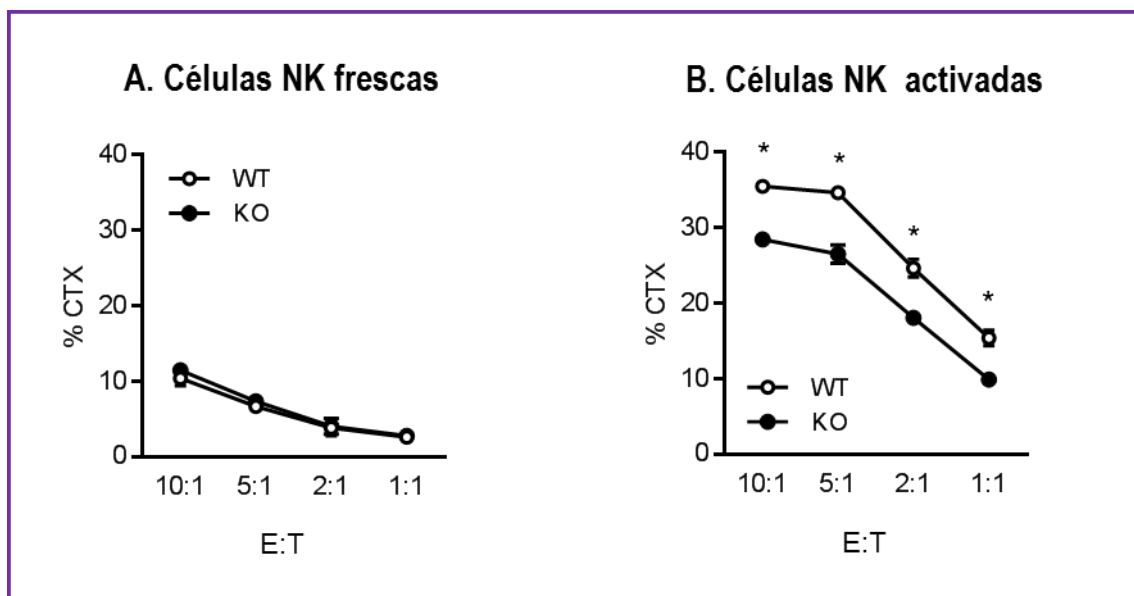
**A.** Co-cultivo de células BMDCs WT inmaduras con células NK purificadas de bazo de ratones WT, en presencia o no de estímulos para su maduración (LPS y Polyl:C, durante 24h. BMDC sola (blanco) BMDC+NK (negro). **B.** Activación de BMDCs inmaduras en cocultivos en presencia o ausencia de células NK purificadas de bazo de ratones WT e ICOS-KO. BMDC WT sola (rayado horizontal); NK KO sola (cuadros); NK WT:BMDC WT (blanco); NK KO:BMDC WT (gris claro); NK WT:BMDC KO (gris oscuro) y NK KO:BMDC KO (negro). \*p<0.05.

6.7.5 Efecto de la interacción ICOS:ICOS-L en la función citotóxica de NKs

El avance de las NK en su proceso madurativo determina la adquisición de nuevas competencias funcionales, mostrando mayor capacidad citotóxica y de producción de citoquinas en los estadios más maduros (Fu et al., 2011, Hayakawa and Smyth, 2006, Hayakawa et al., 2006).

Por tanto, analizamos otra de las principales funciones de las células NK, su actividad citolítica frente a células diana. En los ensayos de citotoxicidad empleamos células YAC-1 marcadas con CFSE y células NK como efectoras, recién purificadas (Figura 36 A) o tras su activación durante 6 días con IL-2 (Figura 36 B).

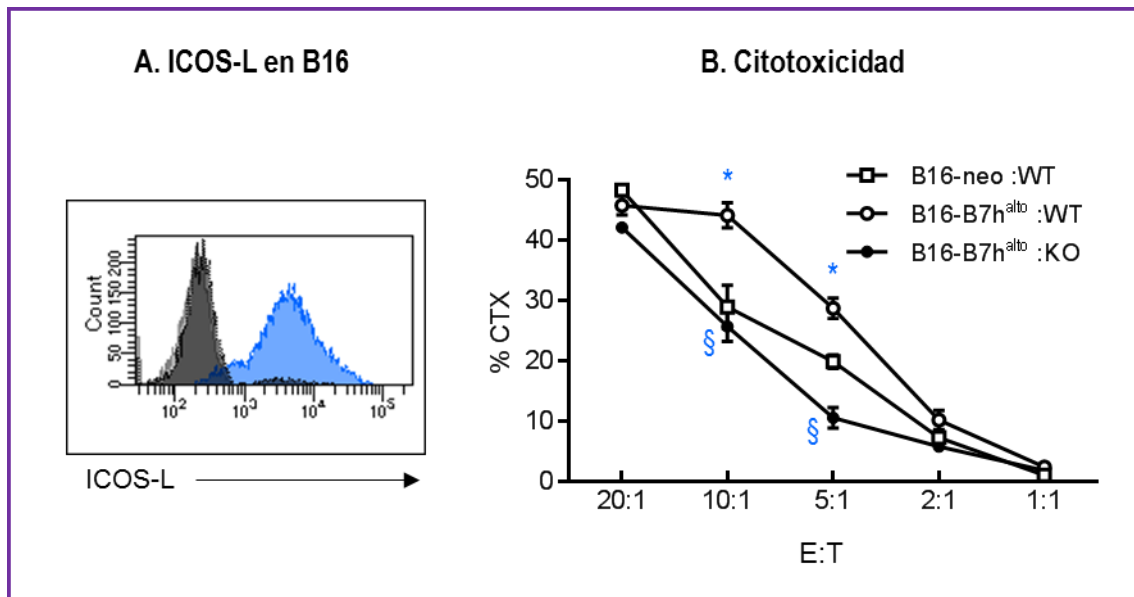
El tratamiento con IL-2 produjo un aumento de la actividad citotóxica en células NK activadas WT o ICOS-KO, pero también puso de manifiesto una capacidad citolítica significativamente menor en las NK de ratones ICOS-KO al compararlas con las WT (Figura 35 B). Las células YAC-1 no expresan ICOS-L (datos no mostrados), poniendo de manifiesto que en este sistema la interacción homotípica ICOS:ICOS-L, sobre la propia NK, es la causante de la mayor capacidad citolítica encontrada en las ensayos con NK WT.



**Figura 36. La interacción ICOS:ICOS-L homotípica es importante para la capacidad citotóxica en células NK activadas.**

Porcentajes de citotoxicidad específica de células YAC-1 al enfrentarlas con (A) células NK de bazo frescas y purificadas o (B) células NK cultivadas durante 6 días con IL-2 (2000 U/ml). Los ratios E: T (efectora: *target*) se indican en el eje. Datos de un experimento representativo con tres ratones. \* $p < 0.05$ . Símbolos: WT (círculos blancos) y KO (círculos negros).

Nos planteamos a continuación analizar el efecto del par ICOS/ICOS-L utilizando otra línea celular que expresara el ligando de ICOS para estudiar el efecto de la interacción heterotípica NK-ICOS: ICOS-L-diana. Para ello, realizamos experimentos utilizando como diana la línea de melanoma murino B16.F10. Este tipo celular expresa niveles muy bajos de ICOS-L, por lo que utilizamos transfectantes de ICOS-L (B16-B7h<sup>alto</sup>) sobre dicha línea, seleccionados para alta expresión de esta molécula, comparándolos con células transfectadas con un vector control (B16-neo).



**Figura 37. La interacción ICOS: ICOS-L heterotípica favorece la capacidad citotóxica de las células NK.**  
**A.** Expresión de ICOS ligando en la línea células B16. Control de isotipo de B16-neo (gris). Tinción de B16-neo (negro). Tinción de B16-B7h<sup>alto</sup> (azul): Línea B16 transfectada con ICOS ligando y sorteada para seleccionar las células tumorales ICOS-L<sup>alto</sup>. **B.** Porcentajes de citotoxicidad específica de células B16 al enfrentarlas con células NK cultivadas durante 4 días con IL-2 (2000 U/ml). Ratios E: T (efectora: *target*) se indican en el eje. Datos de un experimento representativo con tres ratones. \* $p < 0.05$  Comparando B16-neo: NK WT y B16-B7h<sup>alto</sup>: NK WT. §  $p < 0.05$  Comparando B16-B7h<sup>alto</sup>: NK WT y B16-B7h<sup>alto</sup>: NK KO.

En el histograma (Figura 37 A) se observa la elevada expresión de ICOS-L en las células transfectadas y seleccionadas B16-B7h<sup>alto</sup>, comparadas con el control de isotipo y el transfectante control. En los ensayos de citotoxicidad empleamos las células B16 marcadas con CFSE como células diana y células NK preactivadas con IL-2 (2000 U/ml) durante 4 días como efectoras (Figura 37 B). La expresión de ICOS-L en la célula diana (B16-B7h<sup>alto</sup>) aumentó la citotoxicidad por las NK tipo WT, como se observa al comparar con el ensayo en presencia del control B16-neo (Figura 37 B). La ausencia de interacción heterotípica NK-ICOS: ICOS-L-diana en los ensayos con NK de ratones ICOS-KO parece responsable de la deficiente respuesta citolítica observada en este caso (Figura 37 B).

## 6.8 Efecto de la deficiencia de ICOS en la respuesta NK *in vivo*

### 6.8.1 La respuesta NK de ratones ICOS-KO frente a PolyI:C *in vivo* está disminuida

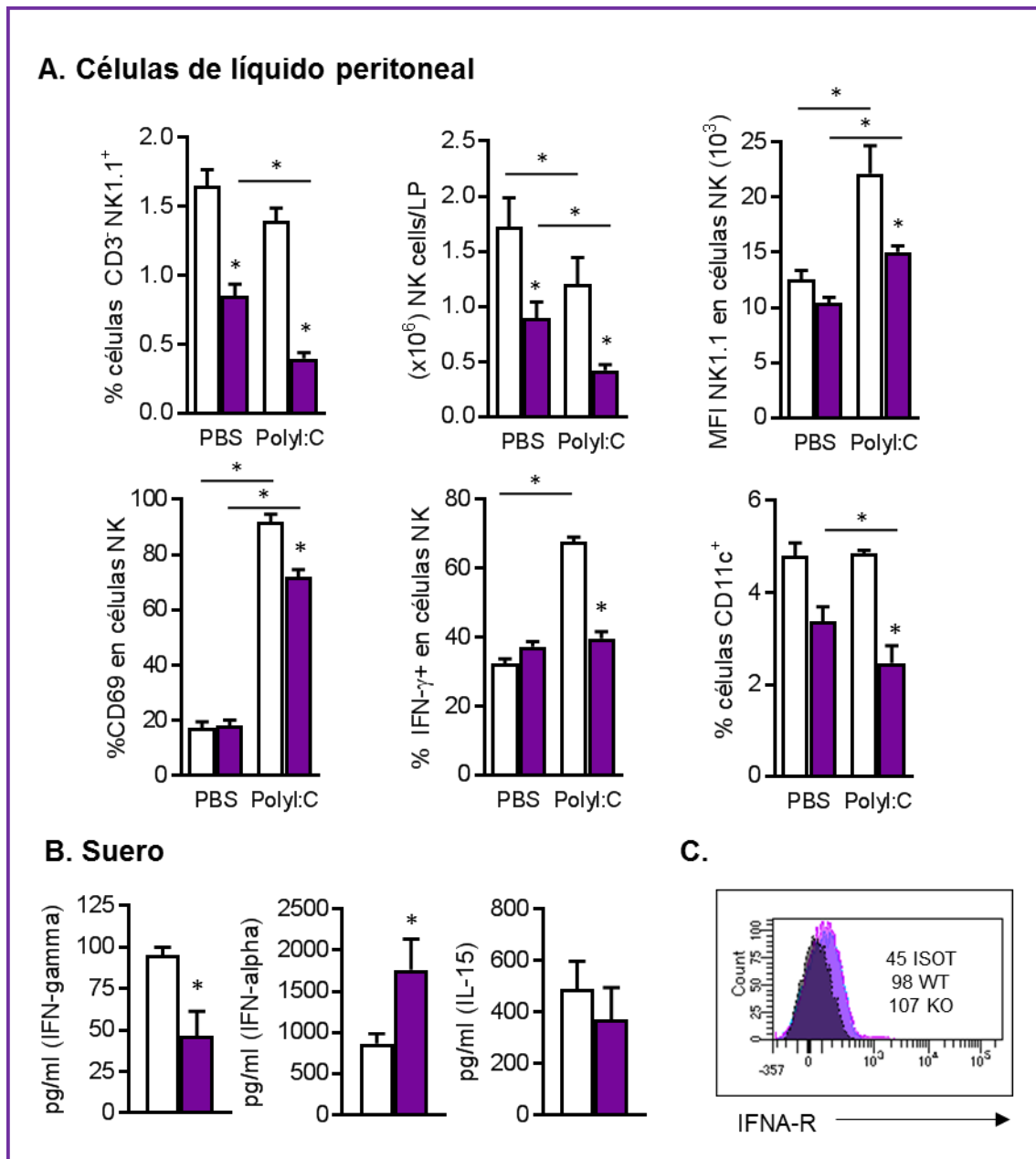
Debido a que el papel de las NK en la respuesta inmune puede ser muy influido por las condiciones de su microambiente (citoquinas y células accesorias que las rodean), realizamos una serie de experimentos *in vivo* para comprobar el papel de ICOS en las NK en un contexto más fisiológico. Las células NK tienen un papel esencial en la eliminación de células infectadas por virus. El ácido poliinosínico-policitidílico (polyI:C), análogo de ARN bicatenario reconocido por TLR3, activa las células NK *in vivo*.

Realizamos inoculación intraperitoneal de polyI:C en ratones WT e ICOS- KO y analizamos el suero de los animales y las subpoblaciones presentes en líquido peritoneal a distintos tiempos. Los niveles de citoquinas en suero fueron determinados a las 8 horas de la inoculación y la activación de las células NK a las 18 horas. Estos tiempos fueron determinados como óptimos en la puesta a punto de los experimentos.

Al analizar las células NK de peritoneo, encontramos un descenso en el número de células y en la activación de las NK por polyI:C en los ratones ICOS-KO, valorado por la expresión de los marcadores de superficie NK1.1 y CD69 (Figura 38 A). También se observó una producción intracelular de IFN- $\gamma$  deficiente en estos animales al compararlos con los WT. Las células dendríticas presentes en peritoneo, que pueden estar ejerciendo un papel importante en la activación de las NK a través de sus receptores TLR3, también estaban mermadas en los ratones deficientes en ICOS (Figura 38 A).

En cuanto a las citoquinas en el suero (Figura 38 B), observamos en los ratones deficientes en ICOS un descenso significativo en los niveles de IFN- $\gamma$ , indicando una respuesta deficiente de los ratones ICOS-KO al polyI:C *in vivo* (Figura 38B panel izquierdo).

Al analizar las citoquinas en suero producidas mayoritariamente por las DCs en respuesta a polyI:C, observamos un incremento de la secreción de IFN- $\alpha$  en el suero de los ratones ICOS-KO y un descenso (no estadísticamente significativo) de la IL-15 (Figura 38 B paneles centro y derecha). El IFN- $\alpha$  es un IFN tipo I que se induce fuertemente por la activación de los TLRs en DCs y activa no sólo células NK sino también las DCs de forma autocrina produciendo la subsecuente expresión de IL-15 por las DCs, que es un factor de crecimiento y activación de NKs. Nuestros resultados indican una mayor secreción de IFN- $\alpha$  en el suero de ratones ICOS-KO en respuesta a polyI:C, pero una menor producción de IL-15, lo que podría justificar los menores niveles de IFN- $\gamma$  producidos por las NK de los ratones ICOS-KO en respuesta a polyI:C.



**Figura 38. Respuesta deficiente de los ratones ICOS-KO a poly I:C *in vivo*.**

**A.** Porcentajes, números absolutos y expresión de distintos marcadores de las células NK ( $CD3^+NK1.1^+$ ) extraídas de peritoneo tras 18 horas de la inoculación de polyI:C. Se muestran también porcentajes de células dendríticas ( $CD11c^+$ ). **B.** Concentración de distintas citoquinas (ELISA) en el suero de los ratones a las 8 horas de la inyección de polyI:C. \* $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) e ICOS-KO (moradas). **C.** Niveles de expresión de IFN $\alpha$ -R (receptor de IFN $\alpha$ ) en células NK seleccionadas de bazo de ratones WT (azul) y KO (rosa), en gris aparece control de isotipo



### 6.8.2 La respuesta NK de ratones ICOS-KO frente a la infección viral por vaccinia in vivo está disminuida

Las células NK son piezas elementales en la primera línea de defensa contra las infecciones virales. Para analizar el papel de ICOS en la respuesta antiviral de las NK *in vivo*, llevamos a cabo infecciones con virus *Vaccinia* en ratones hembra WT e ICOS-KO.

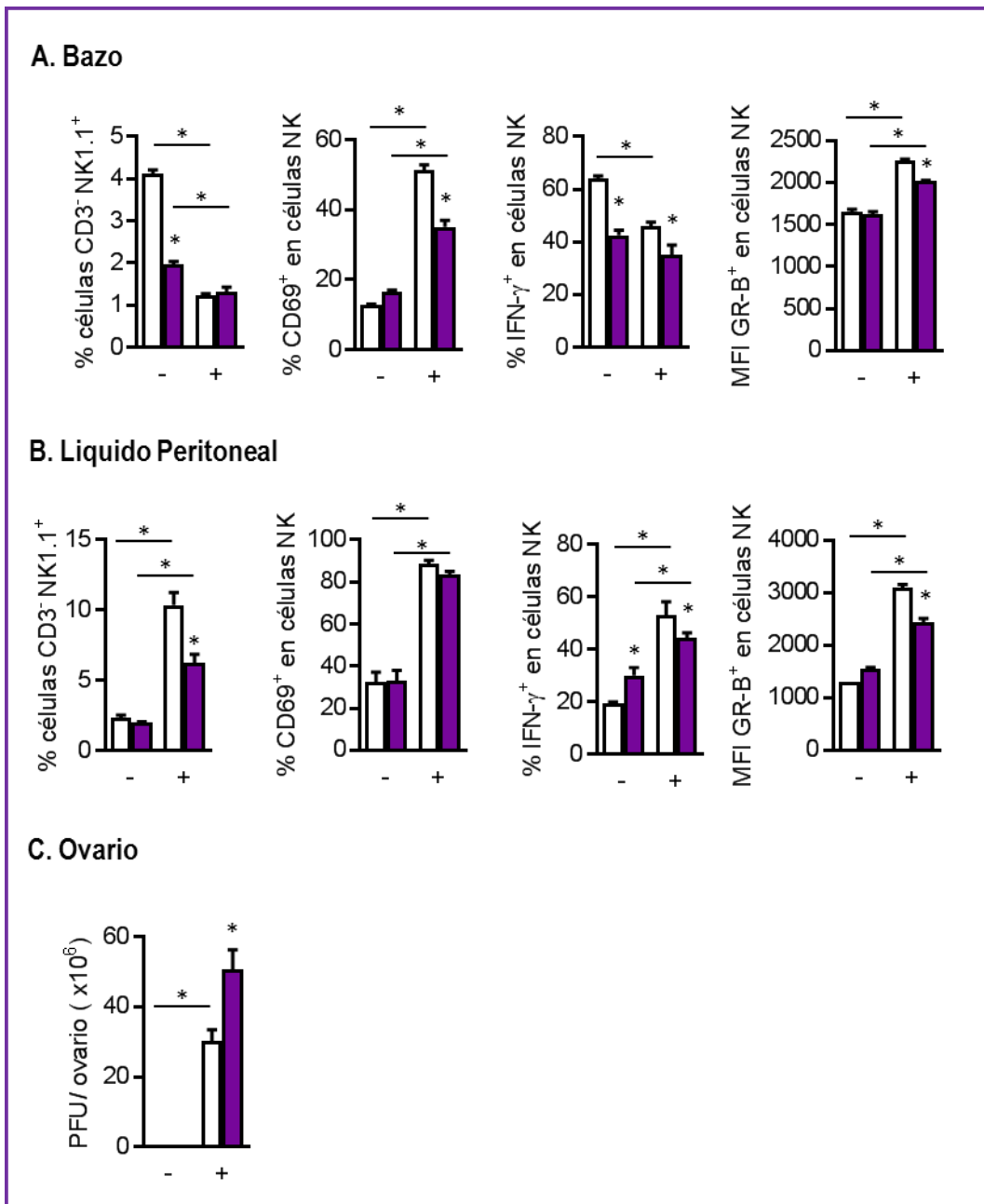
La infección se llevó a cabo intraperitonealmente y se analizaron las células NK de bazo y peritoneo tras 48 horas, así como la carga viral en los ovarios. Tras la infección, se observa un aumento del número de células NK en el peritoneo y un descenso en el bazo (Figura 39 A y B paneles izquierdos), probablemente debido al desplazamiento de estas células hacia el lugar de la infección. En el peritoneo de los ratones infectados se mantiene el déficit de células NK que se observa basalmente en el bazo de animales no infectados (Figura 39 A y B - paneles izquierdos).

La infección viral produce una clara activación de las NK que se manifiesta en el aumento de expresión de CD69, siendo este incremento menor en las NK del bazo de los ratones ICOS-KO (Figura 39 A). En respuesta al virus también se produce un aumento de las NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en el peritoneo con disminución de estas proporciones en los ratones ICOS-KO (Figura 39 B).

Además las células NK de los ratones control WT infectados producen mayores cantidades de granzima B (Figura 39 A y B paneles derechos), al comparar con los controles sin infectar; pero de nuevo la producción de esta molécula efectora está reducida en las células NK de ICOS-KO comparando con los controles WT.

Esta activación comprometida de las células NK está asociada con una carga viral significativamente mayor en los ovarios de los animales ICOS-KO infectados (Figura 39 C), indicando una respuesta antiviral dependiente de NK deficiente asociada a la deficiencia de ICOS en los ratones.

Estos resultados indican que la señalización a través de ICOS es crucial para la activación NK y para el control de la infección por virus *vaccinia in vivo*.



**Figura 39. Activación deficiente de las NK ICOS-KO tras infección por *vaccinia*.**

Porcentajes de células NK ( $CD3^- NK1.1^+$ ) y expresión en ellas de distintas moléculas, tanto en bazo (A) como en líquido peritoneal (B) tras 48 horas de infección intraperitoneal con el virus *vaccinia*. (-: sin infectar. +: infectados). C. Análisis de la carga viral en ovarios de ratones infectados y sin infectar, realizado mediante titulación viral. \*  $p < 0.05$ . Barras: WT (blancas) y KO (moradas)

# Discusión

## 7. Discusión

Las células NK juegan un importante papel como efectoras en la respuesta inmune innata pero también actúan como reguladoras de otras subpoblaciones implicadas en la respuesta inmune adaptativa, convirtiéndose en un importante nexo de unión entre ambos tipos de respuesta.

La señalización a través de moléculas activadoras e inhibidoras determina el estado de maduración y/o activación de las células NK. Cambios en las señales mediadas por citoquinas, bloqueo de señales inhibitorias y contactos célula-célula, disparan los distintos mecanismos de maduración/activación de la subpoblación implicada.

Aunque las células NK se han revelado como reguladores cruciales de la inmunidad, los procesos de su desarrollo y función presentan todavía numerosos interrogantes, y el papel que juega en estos procesos la molécula coestimuladora ICOS es prácticamente desconocido. El hallazgo de defectos en la viabilidad de las NK en ratones ICOS-KO ha sido básico en el planteamiento de esta Tesis Doctoral, conduciendo los estudios hacia el análisis de los procesos que pueden ser determinantes en la homeostasis de NK en situaciones de “reposo” de las células, en ausencia de estímulos infecciosos o tumorales. Además, la expresión concomitante de ICOS e ICOS-L en las poblaciones NK y DC de ratón nos han llevado a analizar las consecuencias funcionales de la presencia de este par coestimulador-ligando en ambos tipos de células innatas.

### **ICOS:ICOS LIGANDO, una pareja crucial en la homeostasis de las células NK**

En este estudio mostramos que la ausencia de ICOS provoca en los ratones un descenso en el número y porcentaje de células NK en bazo y en médula ósea, y también un incremento de apoptosis en dicha población celular. Nuestros resultados indican que ICOS está implicado en la homeostasis de las células NK, un papel que no ha sido descrito previamente y que es relevante, ya que esta reducción del número y el aumento de la apoptosis de NK en ratones ICOS-KO pueden tener importantes implicaciones funcionales. Nuestros resultados descartaron posibles defectos en las cadenas del receptor de IL-2/IL-15, citoquinas cruciales para la supervivencia NK, o un papel de la interacción TRAIL:TRAIL-R en las NK-ICOS-KO.

Se ha descrito un papel de ICOS en la homeostasis y apoptosis de células T reguladoras naturales y NKT (Burmeister et al., 2008, Akbari et al., 2008, Chung et al., 2008). Las células NKT, comparten algunas características con los linfocitos T y están relacionadas también con las células NK, compartiendo un progenitor linfoide común (Sitnicka, 2011), la expresión del marcador NK1.1 y del factor de transcripción Tbet (Geiger and Sun, 2016, Zook and Kee, 2016). Pero a diferencia de las células NKT, las NK

prácticamente no expresan constitutivamente ICOS, sino que este coestimulador es inducido por IL-2, y otras citoquinas, como han mostrado nuestros resultados y estudios anteriores (Ogasawara et al., 2002).

Datos recientes muestran que ICOS también juega un importante papel en la homeostasis y función de células ILC2 (Maazi et al., 2015, Maazi and Akbari, 2015, Paclik et al., 2015), una población de células innatas que expresa ICOS de forma constitutiva y tiene importantes funciones “*helper*” mediadas por la secreción de citoquinas de tipo Th2. Los estudios realizados sobre células ILC2 (Paclik et al., 2015, Maazi et al., 2015, Maazi and Akbari, 2015) vienen a reforzar nuestro hallazgo del papel de ICOS en la homeostasis y proliferación de células NK (innatas de tipo 1) y DC de ratón (inédita hasta ahora) y resalta la participación de este miembro de la familia CD28 en la biología de las células de la inmunidad innata. De esta forma la importancia de ICOS en células del sistema inmune no se ciñe solo a subpoblaciones de linfocitos que expresan TCR (T y NKT), sino también a poblaciones de NK, ILC2 y dendríticas (nuestros datos y (Maazi et al., 2015)).

Sin embargo, el papel de ICOS no es idéntico en estas poblaciones celulares. En el caso de ILC2 se mostraron diferencias en la respuesta a IL-2 acompañadas por un incremento de CD25 (cadena  $\alpha$  de R-IL-2) y una deficiencia en la señalización a través de STAT-5 en los ratones ICOS-KO analizados (Maazi et al., 2015). Nuestro estudio no ha encontrado alteraciones significativas en la expresión de CD25 en las NK, ni en la fosforilación de STAT-5, aunque la respuesta a IL-2 a largo plazo (7 días) muestra un ligero retraso en la proliferación de las células NK de ratones ICOS-KO.

Asimismo, a diferencia con la población NK, no hemos encontrado diferencias significativas en la proporción y número total de células CD11c<sup>+</sup>, en bazo o médula ósea de los ratones ICOS-KO aunque, dada la heterogeneidad de subpoblaciones de células dendríticas, el efecto de la deficiencia en ICOS podría circunscribirse a subpoblaciones minoritarias concretas que requieran métodos más exhaustivos de identificación.

Un hallazgo de gran trascendencia realizado en esta Tesis ha sido revelar la capacidad de las NK de coexpresar ICOS y su ligando ICOS-L. A diferencia de las NK, las células linfoides de la inmunidad adaptativa expresan ICOS o su ligando de forma excluyente; los linfocitos T activados expresan ICOS y los linfocitos B expresan ICOS-L. Además, la expresión de ICOS-L está regulada por la interacción con ICOS, de forma que niveles altos de ICOS expresados en linfocitos T producen una retroalimentación negativa de la expresión de ICOS-L en los linfocitos B y APCs, como mecanismo regulador de la respuesta inmune adaptativa (Watanabe et al., 2008). Así, se ha observado que ratones que sobreexpresan ICOS en linfocitos T presentan niveles tan bajos de ICOS-L en las APCs que tienen como resultado un fenotipo *in vivo* similar al de ratones ICOS-KO, con deficiencias en la respuesta de Ab y el cambio de clase de las Igs (Watanabe et al., 2008). En esta Tesis mostramos que las células NK y las DC de ratón coexpresan ICOS y su ligando,

revelado por el incremento de ICOS-L en NK, células B y DCs en respuesta a la deficiencia de ICOS, destacando la importancia de la interacción ICOS:ICOS-L para la integridad de la respuesta inmune. El incremento de ICOS-L en las NK de ratones ICOS-KO va acompañado de un incremento de expresión de CD80 y CD86, ligandos de CD28 y miembros también de la familia B7 como ICOS-L.

La coexpresión de ICOS y su ligando se ha descrito en otras células de la inmunidad innata como ILC2 (Maazi et al., 2015, Paclik et al., 2015) y en BMDC humanas. Esto sugiere que los mecanismos de regulación de la expresión del binomio ICOS:ICOS-L son diferentes en las células de la inmunidad innata, sean de origen linfoide (NK, ILC2) o mieloide (BMDCs), y en las células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B). En linfocitos B, la expresión de ICOS-L está regulada a nivel post-transcripcional (Watanabe et al., 2008), pero otros mecanismos como la endocitosis operan en el proceso de retroalimentación negativa de la expresión de ICOS-L (Aragoneses-Fenoll et al., 2017) Los hallazgos realizados en esta Tesis pueden abrir nuevas líneas de investigación sobre el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica de ICOS-L en células NK o DC.

La razón de la permisiva coexpresión de ICOS e ICOS-L en poblaciones innatas es desconocida por el momento y posibilita dos tipos de interacción Receptor-Ligando. De esta forma, se puede producir interacción homotípica (o en *cis*), en la que el receptor y su ligando se encuentra sobre la misma célula; pero también puede producirse interacción heterotípica (o en *trans*), en la que el receptor y su ligando están expresados sobre células adyacentes de la misma o diferente subpoblación, abriendo un gran abanico de oportunidades de comunicación intercelular. Estas posibilidades se esquematizan en la figura 40.

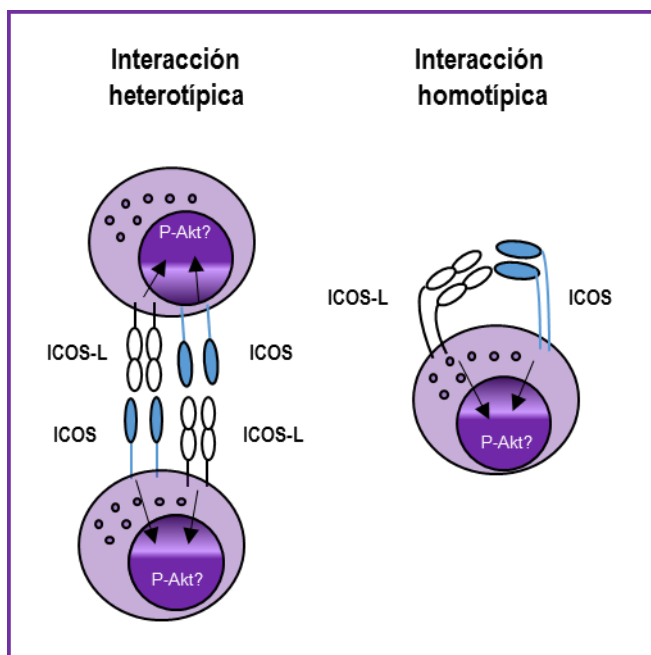


Figura 40. Modelo de interacción homotípica y heterotípica ICOS:ICOS-L en las células NK.

En el caso de ILC2, se ha propuesto que la interacción homotípica (Figura 40) de ICOS con ICOS-L podría producir citoquinas, como IL-13, necesarias para la homeostasis de estas células (Maazi et al., 2015, Maazi and Akbari, 2015). En las BMDC humanas, la interacción homotípica ICOS:ICOS-L produce señalización intracelular que conduce a incrementos en la secreción de distintas citoquinas. Determinados tipos de pacientes de enfermedad de Crohn presentan polimorfismos (SNP) en el gen de ICOS-L, que determinan menores niveles de expresión y deficiencias en su señalización (Hedl et al., 2014).

En el caso de las NK de ratón, una interacción homotípica ICOS:ICOS-L en las NK (Figura 40), poco frecuente debido al bajo nivel de expresión de ICOS en NK en reposo, podría producir niveles muy bajos de citoquinas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis, deficiente en el caso de los ratones ICOS-KO. En nuestras condiciones no hemos podido detectar la secreción de factores de crecimiento necesarios para la homeostasis de NK, como IL-2 o IL-15, cuando ICOS o ICOS-L son señalizados en estas células; pero sí hemos detectado secreción de IFN- $\gamma$  cuando las NK son coestimuladas a través de ICOS o ICOS-L en presencia de IL-2, como luego comentaremos. Son necesarios experimentos adicionales para determinar los mecanismos de señalización de ICOS:ICOS-L en la homeostasis de NK.

Las células NK no son entidades aisladas, sino una población heterogénea que actúa en el contexto de la respuesta inmune a través de interacciones célula-célula y secreción de citoquinas, de forma que las alteraciones de esta población pueden desencadenar desequilibrios en la respuesta inmune del organismo. En este contexto, hemos analizado la interacción de las células NK con dendríticas inmaduras en condiciones de “homeostasis”, en ausencia de estímulos infecciosos o citoquinas añadidas al cultivo. Nuestros resultados resaltan la importancia de la interacción NK: BMDCi en la biología de las células NK. La presencia de BMDC en el co-cultivo, incluso BMDCs inmaduras, produce una activación de las células NK, medida como incremento de la expresión de marcadores de activación como NK1.1, CD69, ICOS, granzima B e IFN- $\gamma$  en estas células (Figura 33). La falta de ICOS en la población NK o en la población BMDCi resulta en una respuesta deficiente de las NK. Esto indica que es necesaria la presencia del binomio ICOS/ICOS-L en ambas subpoblaciones para que la respuesta de las NK sea óptima. Las BMDCi-WT (que expresan ICOS e ICOS-L) podrían proporcionar una señal “tónica” de activación a las NK-WT que permitiera mantener su viabilidad; justificando los defectos en número de NK encontrados en ratones ICOS-KO. Estas conclusiones se esquematizan en la figura 41.

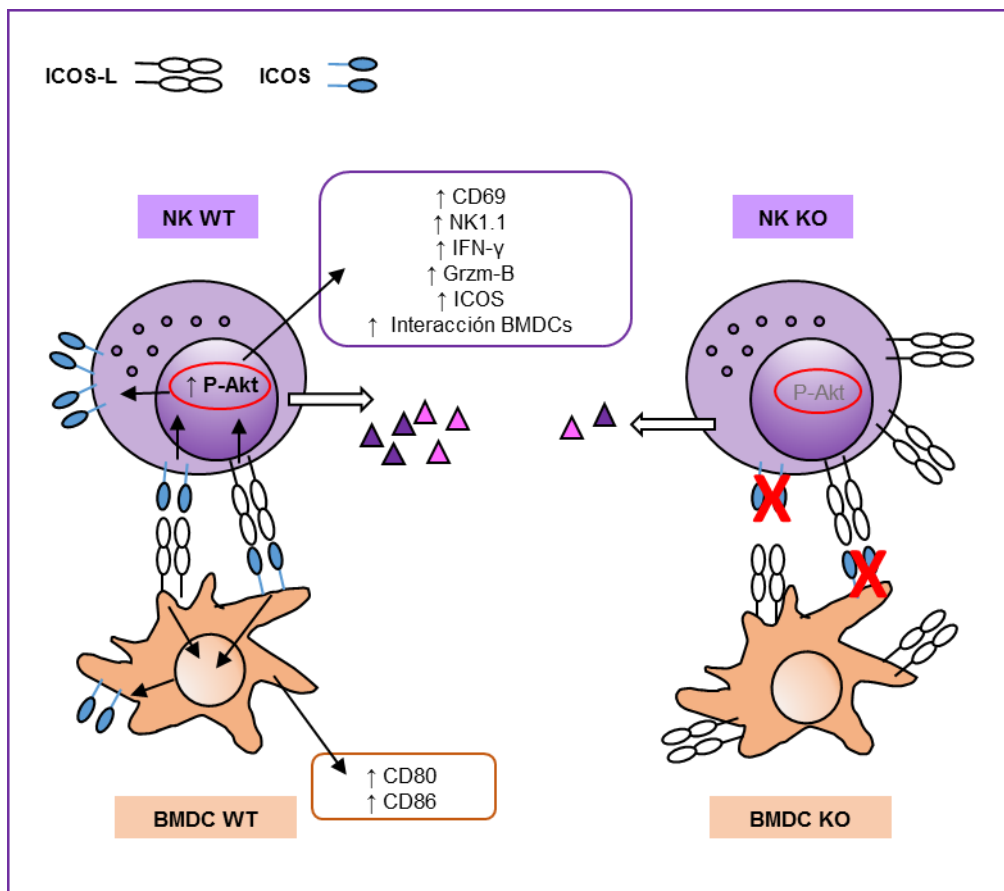


Figura 41. Modelo hipotético de la interacción entre las células NK y las BMDC mediada por ICOS e ICOS-L.

Además, hipotéticamente, la interacción homotípica ICOS:ICOS-L en la BMDC podría inducir la secreción de concentraciones bajas de algunas citoquinas importantes para el crecimiento de NK, por ejemplo IL-2 o IL-15, facilitando esa señal “tónica” necesaria para la homeostasis adecuada de dichas células. En nuestras condiciones, no hemos podido detectar la producción de IL-2 por parte de las DCs, aunque ha sido reportada la secreción de esta citoquina por BMDC cuando son maduras en presencia de estímulo infeccioso (Granucci et al., 2004). También, la interacción homotípica ICOS:ICOS-L en las NK, podría producir niveles muy bajos de citoquinas, como IFN- $\gamma$ , que estimularan a las DC y retroalimentaran el circuito de mantenimiento de la homeostasis celular. Otra posibilidad es que la coexpresión de ICOS e ICOS-L sobre NK y BMDC asegure una interacción más versátil con otras subpoblaciones que expresen la pareja adecuada, facilitando el disparo de una respuesta innata rápida y eficaz.

ICOS, como CD28, señala intracelularmente a través de PI3K ya que presenta un motivo YxxM en su porción citoplásmica que tras fosforilación en tirosina es capaz de reclutar PI3K (Fos et al., 2008, Acosta et al., 2011). Su activación conduce así a una producción de fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3) y a



la estimulación de las quinasas Akt y mTOR (diana de la rapamicina). La vía PI3K-Akt-mTOR promueve la proliferación celular y la supervivencia (Simpson et al., 2010) y es esencial para modular el desarrollo, la diferenciación y la activación de las células inmunes (Nandagopal et al., 2014, Marcais et al., 2014). Concretamente, en las células NK la vía PI3K tiene un papel claro en la regulación de la reestructuración del esqueleto de actina, la formación de la sinapsis inmune, la quimiotaxis, la producción de citoquinas y la competencia citolítica (Gumbleton and Kerr, 2013). Nuestros análisis de intermediarios de señalización intracelular muestran que en la activación de las células NK a través de ICOS y también a través de ICOS-L, se fosforilan proteínas intracelulares relacionadas con la supervivencia, como Akt. ICOS:ICOS-ligando es un par monógámico (Nurieva, 2005); de esta forma, a pesar del incremento de ICOS-L observado en las células NK de ratones ICOS-KO, el déficit de ICOS en los ratones podría justificar un déficit en señal "tónica" a través de Akt que tenga como consecuencia una menor supervivencia de las NK y las alteraciones en desarrollo, en secreción de citoquinas o citotoxicidad contra líneas tumorales.

Nuestro estudio de la expresión de PI3K en NK ha revelado que las isoformas catalíticas expresadas mayoritariamente en estas células son p110 $\alpha$  y p110 $\delta$ . Mediante el uso de inhibidores específicos hemos delimitado la implicación de ambas isoformas, p110 $\alpha$  y  $\delta$ , en los procesos de activación y secreción de IFN- $\gamma$  de las NK. Nuestros resultados indican un efecto comparable de los inhibidores de p110 $\alpha$  (A-66) y p110 $\delta$  (IC87114). Esto sugiere que la isoforma p110 $\alpha$ , a pesar de estar menos expresada que p110 $\delta$  en NK, juega un papel importante en los procesos de activación por IL-2 y secreción de IFN- $\gamma$ . Esto es particularmente interesante para nosotros debido a la asociación preferencial de ICOS con esta isoforma p110 $\alpha$  (Acosta et al., 2011), relacionando por otras vías la implicación de ICOS y PI3K en la biología de las células NKs. El inhibidor dual ETP46321 produjo un efecto aditivo, sugiriendo que las rutas de activación a través de p110 $\alpha$  y  $\delta$  no son redundantes en cuanto a la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$ . ETP46321 ha sido ensayado como antitumoral en modelos animales (Martinez Gonzalez et al., 2012, Granda et al., 2013) pero se precisa un estudio más detallado de la respuesta de NK en presencia de estos inhibidores para obtener conclusiones sobre su posible impacto en aspectos como la respuesta frente a tumores, y valorar su efecto sobre los mecanismos de citotoxicidad.

Otro mediador intracelular que podría estar implicado en el fenotipo alterado de las NK de los ratones ICOS-KO, es la osteopontina (OPN). OPN es una fosfoproteína expresada en dos isoformas, intracelular y secretada. La forma intracelular regula la homeostasis y la función de células NK (Leavenworth et al., 2015b), de forma que los ratones OPNi-KO presentan un fenotipo muy parecido a los ICOS-KO en las células NK: Aumento de apoptosis, acúmulo de estadios inmaduros de NK, disminución de la expresión de Eomes, además de defectos en la respuesta a IL-15 y disminución de NKs de memoria (Leavenworth et al., 2015b). La participación de OPNi en estos procesos será valorada próximamente.

Además, en células T foliculares helper (Tfh) y T foliculares reguladoras (Tfr), la activación de ICOS promueve la interacción de OPNi con p85 $\alpha$  PI3K, facilita la traslocación de OPNi al núcleo donde interacciona con Bcl-6 y lo protege de la degradación (Leavenworth et al., 2015a). De esta forma, OPNi constituye un puente de unión entre ICOS y el factor de transcripción Bcl-6, imprescindible para la adquisición del fenotipo Tfh y Tfr. Queda por explorar si OPNi sirve también de puente entre ICOS y factores de transcripción determinantes en la diferenciación y adquisición de funciones de las NK como T-bet y Eomes.

### **ICOS en el desarrollo de las células NK**

Además de un defecto en su número y en su supervivencia, nuestros resultados muestran que las células NK de ratones ICOS-KO presentan un retraso madurativo desde estadios muy tempranos, con alteraciones en marcadores como CD122 (cadena  $\beta$  IL-2R), o NK1.1, que aparecen en los primeros estadios del desarrollo de estas células; acumulándose precursores de NK tanto en bazo como en médula ósea de ratones ICOS-KO.

El desarrollo de células NK es un proceso complejo y estrictamente regulado, que depende de factores intrínsecos y extrínsecos y se puede dividir en dos fases, compromiso de linaje y maduración, identificando en cada una de ellas varias subpoblaciones NK o estadios de maduración; cada uno definido por un conjunto variado de marcadores de superficie celular (Goh and Huntington, 2017). El compromiso de linaje tiene lugar principalmente en la médula ósea, órgano que juega un papel importante en el desarrollo de células NK, proporcionando las señales ambientales necesarias para su orientación hacia este tipo de células y su posterior diferenciación a NK. Desde la médula ósea, estas células pasan a la periferia donde tiene lugar la terminación de la maduración o sucesiva adquisición de los distintos receptores NK implicados en el reconocimiento de células diana, o la educación de células NK mediante citoquinas o receptores inhibidores, que llevan finalmente a la aparición de células NK más diferenciadas y con plena capacidad funcional. Aunque ICOS apenas se expresa en una fracción menor de células NK periféricas, nuestros datos muestran que ICOS se expresa en niveles iguales o superiores en la médula ósea en la población CD3-CD122<sup>+</sup>, tanto antes como después de la adquisición del marcador temprano de linaje NK1.1 y predominantemente en células NK CD11b<sup>-</sup>, inmaduras. Los ratones ICOS-KO expresan niveles de CD122 y de NK1.1 inferiores a los que presentan los WT, por lo que la deficiencia de ICOS puede estar relacionada con la adquisición de la expresión de estos marcadores. Así, nuestros resultados sugieren que la expresión de ICOS puede ser un paso definitivo durante la diferenciación de NK en la médula ósea, del que no hemos encontrado referencias anteriores.

Para el análisis del proceso de desarrollo de las NK en los ratones ICOS-KO, nos hemos basado en la expresión de los marcadores CD27 y CD11b, que permiten definir cuatro subpoblaciones con distinto grado

de madurez funcional, y que se desarrollan secuencialmente (Chiossone et al., 2009), como se comentó en la Introducción. En el caso de los ratones deficientes en ICOS, hemos observado un sesgo hacia las subpoblaciones NK más inmaduras definidas por marcadores como CD27, CD11b, CD49 o KLRG1 (Figura 42) tanto en el bazo como en la médula ósea. Aunque en bazo las poblaciones predominantes son las más maduras, también contiene precursores CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> (NKP). Estos precursores pueden representar un estadio transicional y han sido previamente descritos en este órgano (Takeda et al., 2005). Sobre el origen de estos precursores, se han propuesto teorías que, o bien apoyan que las NK en diferentes estados de maduración pueden circular a través de la sangre, o bien que otros órganos, distintos de la médula ósea, pueden servir como centros de generación/ desarrollo de las células NK (Di Santo and Vosshenrich, 2006, Wu et al., 2012).

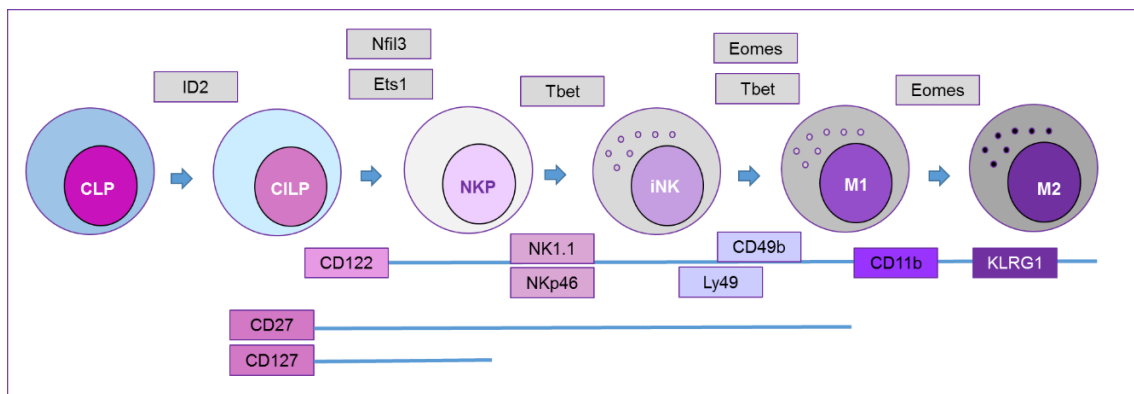


Figura 42. Esquema de la maduración de células NK convencionales.

Los factores de transcripción T-bet y Eomes están implicados en el desarrollo de las células NK, en su maduración final en la periferia y en su funcionalidad (Simonetta et al., 2016). El desarrollo de las NK está profundamente deteriorado en ausencia de ambos factores (Gordon et al., 2012) y parecen ser esenciales para mantener la identidad de linaje de estas células, ya que la pérdida temporal de ambos factores de transcripción de la familia T-box parece anular la expresión de NK1.1 y NKp46 en células que ya estaban establecidas como células NK maduras; sin embargo los fenotipos de sus deficiencias no son idénticos, jugando papeles aparentemente distintos pero quizás complementarios.

T-bet es imprescindible para el desarrollo de varios tipos de ILC, incluyendo las ILC-1 y 3 (Powell et al., 2012, Klose et al., 2013, Rankin et al., 2013); también es necesario para el desarrollo de células NKT (Townsend et al., 2004). En cuanto a Eomes, parece que los microambientes medulares y esplénicos impulsarían la expresión en este factor en las células NK, mientras que el hígado parece no permisivo. Aunque las señales de la inducción de Eomes aún no están claras, es posible que T-bet desempeñe directa o indirectamente un papel en la represión de la expresión de Eomes. Las cantidades más bajas de T-bet parecen encontrarse en células NK de la médula ósea, y así adquieren Eomes más fácilmente en ese

órgano, produciendo etapas posteriores de maduración de células NK que son estrictamente dependientes de la función de Eomes.

Corroborando estas publicaciones, nuestro análisis de los factores de transcripción T-bet y Eomes muestra una expresión menor de T-bet (intensidad de fluorescencia) en las NK CD3<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> de médula ósea que en el bazo de ambos tipos de ratón WT e ICOS-KO. Además, se observa una menor adquisición de la expresión de Eomes en las NK de ratones ICOS-KO, con acúmulo de células T-bet<sup>+</sup>Eomes<sup>-</sup>; esto confirma el retraso madurativo observado en las células NK de los ratones ICOS-KO mediante otros marcadores (NK1.1, CD11b, CD27).

Queda por valorar la posible implicación de la osteopontina intracelular en la expresión de T-bet y Eomes y su relación con la disminución de la expresión de Eomes en los ratones ICOS-KO. Como se comentó anteriormente, OPN<sup>i</sup> está implicada en la homeostasis y maduración de NK (Leavenworth et al., 2015a) y las señales de ICOS promueven la interacción de p85 $\alpha$ -PI3K con OPN<sup>i</sup> y ésta protege al factor de transcripción Bcl-6, master regulador de Tfh, estabilizando así este fenotipo celular (Leavenworth et al., 2015b). Nosotros hemos observado defectos en la homeostasis, maduración y expresión de Eomes en las NK de ratones ICOS-KO. Las señales de ICOS, a través de PI3K y OPN<sup>i</sup> podrían también facilitar la expresión del factor transcripcional Eomes que es determinante en la adquisición de la madurez del fenotipo NK.

Uno de los temas candentes en la identificación de subpoblaciones NK es la “plasticidad” recientemente descrita en células ILC1 (tipo “helper”) y NK convencionales por la modulación de la expresión de Eomes. NK e ILC1 comparten fenotipo de superficie (NKp46, NK1.1) y muchas propiedades funcionales (producción de IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ ), pero muestran diferencias importantes en marcadores de superficie como CD127 y receptores inhibidores específicos de MHC clase I entre otros (Spits et al., 2016, Lim et al., 2017). Los estudios iniciales en ratones identificaron dos subconjuntos de células NK hepáticas distintas que diferían en la expresión de TRAIL y CD49b (Takeda et al., 2005); estos fueron reconocidos más tarde como células NK convencionales Eomes<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> y otras NK residentes en tejidos CD49b<sup>-</sup>Eomes<sup>-</sup> o ILC1 (Daussy et al., 2014). También se han identificado células NK similares en el timo, el intestino, la piel, el útero y las glándulas salivales (revisado en (Spits et al., 2016, Sojka et al., 2014)). En la discusión acerca de la identidad o disparidad de estos dos linajes, pruebas recientes sugieren que las NK pueden generarse a partir de ILC1 al inducir aumento de la expresión de Eomes (Pikovskaya et al., 2016). La expresión de Eomes resulta suficiente para convertir ILC1 T-bet<sup>+</sup> en células NK CD49b<sup>+</sup> portadoras de CD11b, KLRG1 y un repertorio restringido de receptores Ly49 tanto en tejidos linfoides como no linfoides. Estas observaciones sugieren que la plasticidad de células ILC1  $\leftrightarrow$  NK puede producirse mediante modulación de Eomes

El retraso madurativo observado en las poblaciones NK de los ratones ICOS-KO tiene consecuencias funcionales *in vivo*. La capacidad funcional de secreción de citoquinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), de citotoxicidad de células diana y/o multiplicación no es homogénea a lo largo de todo el proceso madurativo (Fu et al., 2011, Chiossone et al., 2009, Hayakawa and Smyth, 2006, Hayakawa et al., 2006). Las NKs inmaduras CD27-CD11b<sup>-</sup> son las más activas en cuanto a multiplicación (Chiossone et al., 2009); esta subpoblación está aumentada en los ratones ICOS-KO, y el organismo podría de esta forma intentar compensar el incremento de apoptosis que hemos observado en estos ratones. Nuestros resultados muestran que la producción mayoritaria de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  no coincide en la misma subpoblación; es decir, se observa una mayor proporción de células productoras de IFN- $\gamma$  en estados maduros CD11b<sup>+</sup>, pero un acúmulo de TNF $\alpha$  en las inmaduras, CD11b<sup>-</sup> de ratones WT. En los ratones ICOS-KO se observa un desplazamiento de la expresión de IFN $\gamma$  (alta intensidad de fluorescencia) hacia la población inmadura y un fuerte incremento de la presencia de TNF- $\alpha$  en esta subpoblación.

La actividad citolítica mayor es propia de estadios maduros CD27-CD11b<sup>+</sup> (Fu et al., 2011), que son deficitarios en los ratones ICOS-KO. En conjunto, esto podría explicar los defectos funcionales de estos ratones observados en nuestros experimentos de citotoxicidad anti-tumoral *in vitro* y de infección por virus *vaccinia in vivo*. Además, cambios en la secreción de citoquinas, como un aumento de secreción de TNF- $\alpha$  podrían ser determinantes en la relación con poblaciones Treg o DC y en el desarrollo de patologías inflamatorias autoinmunes observado en estos ratones.

En definitiva, las interacciones ICOS:ICOS-ligando juegan un papel importante en el desarrollo de algunas subpoblaciones NK indicando que es posible asignar a ICOS otro papel adicional al de coestimulador de la activación. La expresión de ICOS en células NK y sus precursores es más frecuente en células de médula ósea, aparentemente más inmaduras, en progenitores NK (CD3<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>) y también en células NK que aún no expresan marcadores de activación como CD11b. Esto sugiere un papel para esta molécula coestimuladora durante el desarrollo de subpoblaciones en la médula ósea.

### **Implicación de ICOS en la función de las células NK**

En humanos, la deficiencia homocigótica de ICOS causa una inmunodeficiencia común variable (CVID) (Dong et al., 2001, Yong et al., 2009, Takahashi et al., 2009) con infecciones frecuentes de los tractos respiratorio y digestivo. En conjunto, los defectos en la expresión de ICOS se correlacionan con defectos en la producción de Ab, de las células Tfh en circulación y de la formación de centros germinales, apoyando así un papel para ICOS en la diferenciación de células Tfh humanas y de ratón (Pedros et al., 2016). La deficiencia de ICOS se asocia también a una mayor sensibilidad a enfermedades autoinmunes, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Galicia et al., 2009, Rojo et al., 2008, Rottman et al., 2001, Dong and Nurieva, 2003) pero también a una resistencia a la inducción experimental de artritis en los

ratones (Nurieva et al., 2003). Esto puede estar asociado a la importancia en cada caso de los defectos producidos por la ausencia de ICOS en el compartimiento de células B dependientes de T, así como a alteraciones en las células Treg naturales ICOS<sup>+</sup>, Th17 o NKT.

La implicación de ICOS en la función de las NK ha sido muy escasamente referenciada en ratón (Ogasawara et al., 2002) o en humano (Cairo et al., 2014). En esta Tesis se muestra que la señalización mediada por ICOS y también por ICOS-L (utilizando como ligandos Abs específicos o construcciones recombinantes) produce una estimulación de la secreción de IFN- $\gamma$  mediada por IL-2. En ambos casos se detecta un aumento de la fosforilación de Erk y de Akt, pero no de P38. Esto sugiere una redundancia en las señales emitidas por ICOS e ICOS-L aunque no podemos descartar la activación de otras rutas intracelulares que perfilen la señalización mediada por ICOS o por su ligando. La rápida sobre-expresión de ICOS-L en NK activadas por IL-2 y su capacidad de mediar señales aseguran la activación eficaz de las NK en momentos tempranos de la respuesta en los que la expresión de ICOS es todavía escasa. De esta forma, en el sistema de activación *in vitro* por IL-2 se posibilita la interacción homotípica ICOS:ICOS-L en la misma NK y la heterotípica entre NKs cercanas (Figura 40). La coexpresión de ICOS y de ICOS-L en las células NK activadas por IL-2 conduciría a la estimulación controlada de los mecanismos efectores de secreción de IFN- $\gamma$ .

Además, la coexpresión de ICOS e ICOS-L en NK activadas podría facilitar su interacción con otras células de la inmunidad innata y adaptativa que expresen ICOS o su ligando (por ej. linfocitos T o B de distintos fenotipos y células dendríticas, o células epiteliales y tumorales ICOS-L<sup>+</sup>), optimizando así la relación de las NK con muchos tipos celulares en el organismo *in vivo* y coordinando la relación entre la inmunidad innata y la adquirida. En este aspecto, hemos valorado la respuesta de las NK a BMDCs maduras, en presencia de LPS o PolyI:C, simulando *in vitro* una respuesta a un estímulo infeccioso bacteriano o viral. En las BMDCs maduras se produce un aumento de la expresión de ICOS y una *down-regulación* parcial de ICOS-L, como hemos mostrado. La presencia de BMDCs WT maduras en los co-cultivos produce una estimulación eficiente de las NK WT, valorado como incremento de la expresión de ICOS y CD69 en las NK. La presencia de BMDC-ICOS-KO en los co-cultivos en presencia de PolyI:C produce una respuesta deficiente de las NK-WT, resaltando el importante papel de las BMDCs maduras ICOS<sup>+</sup> sobre la respuesta inmune de las NK.

El PolyI:C es un ligando de TLR3 capaz de inducir una respuesta anti-viral, pero también es un adyuvante prometedor en vacunas contra el cáncer debido a su inducción de potentes respuestas antitumorales que se producen principalmente a través de la activación de DC y células NK (Guillerey et al., 2015). Aunque se describió la capacidad de TLR3 para activar las células NK (Schmidt et al., 2004), posteriormente se ha comprobado que las señales de TLR3 se producen a través de distintas moléculas adaptadoras como TRIF

(Miyake et al., 2009) presentes en las DCs pero no en NKs. Por tanto, PolyI:C activaría la vía dependiente de TRIF en DCs, que a su vez conducirían a la activación de las células NK, p.e. por medio de IFN- $\alpha$ .

La complejidad de la respuesta inmune en el organismo es solo parcialmente reproducida *in vitro*. Por ello y para completar el estudio del papel de la interacción ICOS:ICOS-L en células NK, hemos llevado a cabo experimentos *in vivo*, en los que la respuesta a PolyI:C supone una coordinación de toda una plétora de interacciones celulares mediadas por citoquinas y por contacto célula-célula. Hemos mostrado que, *in vivo*, la respuesta a PolyI:C se manifiesta con menores niveles de IFN- $\gamma$  y en el suero de los ratones ICOS-KO. Sin embargo, y sorprendentemente, los niveles de IFN- $\alpha$  en suero están elevados; esta citoquina se produce muy eficientemente por DC plasmacitoides y monocitos en respuesta a estímulos virales, produciendo activación de NK y un incremento de expresión de IL-15 en DC que sirve de estímulo para las NK (Anguille et al., 2015). En nuestro caso, hemos observado que el incremento de IFN- $\alpha$  en los ratones ICOS-KO tratados con PolyI:C no se corresponde con un incremento de IL-15 ni de IFN- $\alpha$  en el suero y que se produce una activación deficiente de las NK de estos ratones *in vivo*. Por el momento desconocemos las causas moleculares que hacen fallar el adecuado incremento de IFN- $\alpha$  en los ratones ICOS-KO tratados con PolyI:C *in vivo*, pero no parece debido a defectos en la expresión del receptor de IFN- $\alpha$  en las NK.

El papel de ICOS en modelos de infección ha sido estudiado en ratones enfocado hacia la respuesta de células T (revisado en (Wikenheiser and Stumhofer, 2016, Kopf et al., 2000), pero no hemos encontrado antecedentes de su efecto sobre la respuesta anti-infecciosa mediada por NKs. Por ello, para completar este estudio hemos realizado experimentos de infección de ratones con virus *vaccinia*. Nuestros resultados indican una deficiencia de los ratones ICOS-KO para movilizar NK desde el bazo hacia el foco infeccioso (peritoneo) y una respuesta deficiente en la activación de NK. El defecto en la movilización de NK podría estar relacionada con los defectos observados en la motilidad dependiente de ICOS y PI3K en células T (Acosta, 2012, Acosta et al., 2011). Como resultado, los títulos de virus detectados en ovario son mayores en los ratones ICOS-KO indicando una deficiente respuesta mediada por NK *in vivo*.

El papel de ICOS en la citotoxicidad mediada por NK, en modelos de respuesta a tumores, ha sido reportado por Ogasawara (Ogasawara et al., 2002); la expresión de ICOS-L en el tumor facilita la eliminación de éste. Sin embargo, también la expresión de ICOS-L en tumores como, p.e. melanomas, puede facilitar la interacción, activación y expansión de células T reguladoras ICOS<sup>+</sup> (Martin-Orozco et al., 2010) dando lugar a supresión de la respuesta inmune anti-tumoral. El análisis de la relación entre NKs y Treg en los procesos de respuesta inmune a tumores podrá resolver algunos de estos interrogantes. La interacción con ICOS también inhibe la motilidad de células ICOS-L normales y tumorales, así como la formación de metástasis en modelos de melanoma (Dianzani et al., 2014). Además, esta interacción con ICOS ha sido aprovechada en vacunas anti-tumorales en las que se observa que la expresión de ICOS-L por las células tumorales de



la vacuna aumentan la eficiencia de inmunoterapia con anticuerpos anti-CTLA-4 en modelos experimentales de melanoma y cáncer de próstata (Fan et al., 2014).

En esta Tesis hemos realizado estudios preliminares del papel de la interacción ICOS:ICOS-L en la respuesta anti-tumoral mediada por NK. Hemos mostrado defectos de capacidad citolítica en células NK de ratones ICOS-KO, en ensayos *in vitro*, frente a células YAC-1. Esta línea no expresa ICOS-L, luego la diferencia encontrada en NK-WT frente a ICOS-KO apoyaría que la mejor respuesta obtenida en NK-WT es debida al efecto beneficioso de la interacción homotípica ICOS-ICOS-L en la NK-WT. Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad utilizando líneas B16 transfectadas expresando altos niveles de ICOS-L muestran defectos en las NK-ICOS-KO, en los que no puede producirse la interacción heterotípica con ICOS-L expresado en la célula diana; estos resultados resaltan el efecto beneficioso de la interacción intercelular mediada por ICOS:ICOS-L para facilitar el potencial citolítico de las NK.

A la vista de estos resultados, se confirma el interés de la realización de experimentos adicionales *in vivo* para analizar el papel de ICOS e ICOS-L en la respuesta anti-tumoral mediada por NK y de la interacción de esta población con otras, como las células T reguladoras que son determinantes en el resultado final de la respuesta inmune. La complejidad de estos estudios se ve aumentada por el hecho de que tanto las células NK como las DC son capaces de expresar el coestimulador ICOS y su ligando. La utilización de reactivos recombinantes, construcciones de ICOS y de ICOS-L solubles, o anticuerpos específicos para estas dos moléculas abren muchas posibilidades de manipulación terapéutica de la respuesta inmune que ya ha comenzado a estudiarse y podría aplicarse a la respuesta mediada por células NK



# Conclusiones

## 8. Conclusiones

1. Los ratones ICOS-KO presentan un descenso significativo en la proporción y el número de células NK en bazo y en médula ósea, con incremento de su apoptosis. Esto permite atribuir un papel determinante a ICOS en la homeostasis de células NK, con importantes consecuencias funcionales en la respuesta inmune innata.
2. La deficiencia de ICOS en ratón produce un retraso madurativo de las NK en médula ósea y en bazo, determinando un potencial alterado de la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y defectos en la capacidad citotóxica. ICOS se expresa desde estadios muy tempranos en las NK de la médula ósea y parece influir en la adquisición de marcadores de maduración CD122, NK1.1, CD11b y Eomes.
3. La deficiencia en ICOS aumenta la expresión de ICOS-L en varios tipos celulares, incluyendo células B, células dendríticas y las propias NK.
4. ICOS e ICOS-L se co-expresan en NK y BMDC de ratón, especialmente en estados de activación celular. Ambos, ICOS e ICOS-L son funcionales en NK, señalizando al interior celular, produciendo un coestímulo que incrementa algunas señales tempranas como P-Erk y P-Akt, pero no otras como P-p38. La coexpresión de ICOS y su ligando en NK y BMDC abre oportunidades de interacción homotípica y heterotípica ICOS:ICOS-L con posibles implicaciones en la homeostasis y función de las NK y las BMDC de ratón.
5. El co-cultivo de células NK con BMDC inmaduras produce activación en ambas células con incremento de la expresión de ICOS, NK1.1, CD69, granzima B e IFN- $\gamma$  en las NK; y de CD80 y CD86 en las DC. Es necesaria la presencia de ICOS en NK y BMDC, para obtener una respuesta óptima por parte de ambos tipos celulares. Esto resalta la importancia de la interacción heterotípica ICOS:ICOS-L en la fisiología de estas células de la inmunidad innata.
6. La presencia de un estímulo microbiano, LPS o PolyI:C, en el co-cultivo de NK y BMDC produce maduración de las BMDC y una respuesta mayor de las NK. La deficiencia en ICOS en ambos tipos celulares produce una respuesta deficitaria de las NK.

7. Las células NK de ratones ICOS-KO presentan defectos en la citotoxicidad frente a tumores. La expresión de ICOS-L en la célula diana tumoral incrementa la lisis generada por las células NK ICOS<sup>+</sup>,
8. La respuesta *in vivo* a PolyI:C es deficiente en los ratones ICOS-KO; se observa un aumento de IFN- $\alpha$  en el suero pero esto no es suficiente para inducir niveles adecuados de IL-15 ni de IFN- $\gamma$ .
9. Los ratones ICOS-KO presentan una respuesta deficiente al virus *Vaccinia in vivo*, incluyendo movilización deficiente de las NK desde el bazo al líquido peritoneal, menor secreción de IFN $\gamma$  y granzima B y como consecuencia una peor eliminación de la carga viral por las NK.
10. En definitiva, ICOS juega un papel en la homeostasis, la maduración y la función de las células NK. La expresión concomitante de ICOS e ICOS-L en células de la inmunidad innata como NK y DC abre numerosas oportunidades de relación intercelular, complica enormemente la señalización a través de estas vías y remarca la importancia de este coestimulador y su ligando para la integridad de la respuesta inmune.

# Bibliografía

## 9. Bibliografía

- ACOSTA, Y., ZAFRA, M., OJEDA, G., BERNARDONE, I., DIANZANI, U., PORTOLÉS, P. & ROJO, J. 2011. Biased binding of class IA phosphatidylinositol 3-kinase subunits to inducible costimulator (CD278). *Cell. Mol. Life Sci.*, 68, 3065-3079.
- ACOSTA, Y. Y., OJEDA G., ZAFRA M. P., SEREN BERNARDONE I., SÁNCHEZ A., DIANZANI U., PORTOLÉS P. AND ROJO J. M. . 2012. Dissociation of actin polymerization and lipid raft accumulation by ligation of the Inducible Costimulator (ICOS, CD278). *Inmunología*, 31 4-12.
- AKBARI, O., STOCK, P., MEYER, E. H., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H., UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2008. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4+ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J Immunol*, 180, 5448-56.
- AKTAS, E., KUCUKSEZER, U. C., BILGIC, S., ERTEN, G. & DENIZ, G. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*, 254, 149-54.
- ALI, A. K., NANDAGOPAL, N. & LEE, S. H. 2015. IL-15-PI3K-AKT-mTOR: A Critical Pathway in the Life Journey of Natural Killer Cells. *Front Immunol*, 6, 355.
- ALTER, G., MALENFANT, J. M. & ALTFELD, M. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, 294, 15-22.
- ANGUILLE, S., VAN ACKER, H. H., VAN DEN BERGH, J., WILLEMEN, Y., GOOSSENS, H., VAN TENDELOO, V. F., SMITS, E. L., BERNEMAN, Z. N. & LION, E. 2015. Interleukin-15 Dendritic Cells Harness NK Cell Cytotoxic Effector Function in a Contact- and IL-15-Dependent Manner. *PLoS One*, 10, e0123340.
- ARAGONESES-FENOLL, L., GARCÍA-PAREDES, L., MONTES-CASADO, M., OJEDA, G., WAGENER, P., DIANZANI, U., PORTOLÉS, P. & ROJO, J. 2017. Mechanisms of ICOS Ligand (ICOS-L, B7h, CD275) ICOS-dependent downmodulation. Role of raft-dependent endocytosis. *XL Congreso Nacional de la SEI (Zaragoza)*
- ARAGONESES-FENOLL, L., MONTES-CASADO, M., OJEDA, G., ACOSTA, Y. Y., HERRANZ, J., MARTINEZ, S., BLANCO-APARICIO, C., CRIADO, G., PASTOR, J., DIANZANI, U., PORTOLES, P. & ROJO, J. M. 2016. ETP-46321, a dual p110alpha/delta class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor modulates T lymphocyte activation and collagen-induced arthritis. *Biochem Pharmacol*, 106, 56-69.
- ARASE, H., MOCARSKI, E. S., CAMPBELL, A. E., HILL, A. B. & LANIER, L. L. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*, 296, 1323-6.
- AUDIGER, C., RAHMAN, M. J., YUN, T. J., TARBELL, K. V. & LESAGE, S. 2017. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol*, 198, 2223-2231.
- BANH, C., MIAH, S. M., KERR, W. G. & BROSSAY, L. 2012. Mouse natural killer cell development and maturation are differentially regulated by SHIP-1. *Blood*, 120, 4583-90.

- BIRON, C. A. 1999. Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol*, 2, 374-81.
- BIRON, C. A., NGUYEN, K. B., PIEN, G. C., COUSENS, L. P. & SALAZAR-MATHER, T. P. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17, 189-220.
- BOYMAN, O. & SPRENT, J. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 12, 180-90.
- BROIDES, A. & CONLEY, M. E. 2004. The role of inducible co-stimulator (ICOS) in immunodeficiency. *Clin Immunol*, 113, 221-3.
- BURMEISTER, Y., LISCHKE, T., DAHLER, A. C., MAGES, H. W., LAM, K. P., COYLE, A. J., KROCZEK, R. A. & HUTLOFF, A. 2008. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol*, 180, 774-82.
- CAIRO, C., SURENDRAN, N., HARRIS, K. M., MAZAN-MAMCZARZ, K., SAKODA, Y., DIAZ-MENDEZ, F., TAMADA, K., GARTENHAUS, R. B., MANN, D. L. & PAUZA, C. D. 2014. Vgamma2Vdelta2 T cell Costimulation Increases NK cell Killing of Monocyte-derived Dendritic Cells. *Immunology*.
- CERWENKA, A. & LANIER, L. L. 2016. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, 16, 112-23.
- CORTEZ, V. S. & COLONNA, M. 2016. Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. *Immunol Lett*.
- COYLE, A. J., LEHAR, S., LLOYD, C., TIAN, J., DELANEY, T., MANNING, S., NGUYEN, T., BURWELL, T., SCHNEIDER, H., GONZALO, J. A., GOSELIN, M., OWEN, L. R., RUDD, C. E. & GUTIERREZ-RAMOS, J. C. 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*, 13, 95-105.
- CHALIFOUR, A., JEANNIN, P., GAUCHAT, J. F., BLAECKE, A., MALISSARD, M., N'GUYEN, T., THIEBLEMONT, N. & DELNESTE, Y. 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*, 104, 1778-83.
- CHANG, S. Y., KO, H. J. & KWEON, M. N. 2014. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Exp Mol Med*, 46, e84.
- CHIOSSONE, L., CHAIX, J., FUSERI, N., ROTH, C., VIVIER, E. & WALZER, T. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*, 113, 5488-96.
- CHUNG, Y., NURIEVA, R., ESASHI, E., WANG, Y. H., ZHOU, D., GAPIN, L. & DONG, C. 2008. A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells. *J Immunol*, 180, 2276-83.
- DAUSSY, C., FAURE, F., MAYOL, K., VIEL, S., GASTEIGER, G., CHARRIER, E., BIENVENU, J., HENRY, T., DEBIEN, E., HASAN, U. A., MARVEL, J., YOH, K., TAKAHASHI, S., PRINZ, I., DE BERNARD, S., BUFFAT, L. & WALZER, T. 2014. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med*, 211, 563-77.
- DI SANTO, J. P. 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*, 24, 257-86.
- DI SANTO, J. P. & VOSSHENRICH, C. A. 2006. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev*, 214, 35-46.
- DIANZANI, C., MINELLI, R., GIGLIOTTI, C. L., OCCHIPINTI, S., GIOVARELLI, M., CONTI, L., BOGGIO, E., SHIVAKUMAR, Y., BALDANZI, G., MALACARNE, V., ORILIERI, E., CAPPELLANO, G., FANTOZZI, R., SBLATTERO, D., YAGI,

- J., ROJO, J. M., CHIOCCHETTI, A. & DIANZANI, U. 2014. B7h triggering inhibits the migration of tumor cell lines. *J Immunol*, 192, 4921-31.
- DIANZANI, C., MINELLI, R., MESTURINI, R., CHIOCCHETTI, A., BARRERA, G., BOSCOLO, S., SARASSO, C., GIGLIOTTI, C. L., SBLATTERO, D., YAGI, J., ROJO, J. M., FANTOZZI, R. & DIANZANI, U. 2010. B7h triggering inhibits umbilical vascular endothelial cell adhesiveness to tumor cell lines and polymorphonuclear cells. *J Immunol*, 185, 3970-9.
- DOKUN, A. O., KIM, S., SMITH, H. R., KANG, H. S., CHU, D. T. & YOKOYAMA, W. M. 2001. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol*, 2, 951-6.
- DONG, C., JUEDES, A. E., TEMANN, U. A., SHRESTA, S., ALLISON, J. P., RUDDLE, N. H. & FLAVELL, R. A. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409, 97-101.
- DONG, C. & NURIEVA, R. I. 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun*, 21, 255-60.
- FALSCHLEHNER, C., EMMERICH, C. H., GERLACH, B. & WALCZAK, H. 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1462-75.
- FAN, X., QUEZADA, S. A., SEPULVEDA, M. A., SHARMA, P. & ALLISON, J. P. 2014. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med*, 211, 715-25.
- FANG, M., LANIER, L. L. & SIGAL, L. J. 2008. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS Pathog*, 4, e30.
- FORTIN, C., HUANG, X. & YANG, Y. 2012. NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 189, 1843-9.
- FOS, C., SALLES, A., LANG, V., CARRETTE, F., AUDEBERT, S., PASTOR, S., GHIOTTO, M., OLIVE, D., BISMUTH, G. & NUNES, J. A. 2008. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol*, 181, 1969-77.
- FU, B., WANG, F., SUN, R., LING, B., TIAN, Z. & WEI, H. 2011. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*, 133, 350-9.
- GABRIELLI, S., ORTOLANI, C., DEL ZOTTO, G., LUCHETTI, F., CANONICO, B., BUCCELLA, F., ARTICO, M., PAPA, S. & ZAMAI, L. 2016. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *J Immunol Res*, 2016, 1376595.
- GALICIA, G., KASRAN, A., UYTENHOVE, C., DE SWERT, K., VAN SNICK, J. & CEUPPENS, J. L. 2009. ICOS deficiency results in exacerbated IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol*, 29, 426-33.
- GAO, X., ZHAO, L., WANG, S., YANG, J. & YANG, X. 2013. Enhanced inducible costimulator ligand (ICOS-L) expression on dendritic cells in interleukin-10 deficiency and its impact on T-cell subsets in respiratory tract infection. *Mol Med*, 19, 346-56.
- GARCIA-SASTRE, A. & BIRON, C. A. 2006. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*, 312, 879-82.
- GASTEIGER, G., HEMMERS, S., BOS, P. D., SUN, J. C. & RUDENSKY, A. Y. 2013a. IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *J Exp Med*, 210, 1179-87.

- GASTEIGER, G., HEMMERS, S., FIRTH, M. A., LE FLOC'H, A., HUSE, M., SUN, J. C. & RUDENSKY, A. Y. 2013b. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med*, 210, 1167-78.
- GEIGER, T. L. & SUN, J. C. 2016. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, 39, 82-9.
- GEROSA, F., BALDANI-GUERRA, B., NISII, C., MARCHESINI, V., CARRA, G. & TRINCHIERI, G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, 195, 327-33.
- GIROUX, M., YURCHENKO, E., ST-PIERRE, J., PICCIRILLO, C. A. & PERREAULT, C. 2007. T regulatory cells control numbers of NK cells and CD8alpha+ immature dendritic cells in the lymph node paracortex. *J Immunol*, 179, 4492-502.
- GOH, W. & HUNTINGTON, N. D. 2017. Regulation of Murine Natural Killer Cell Development. *Front Immunol*, 8, 130.
- GORDON, S. M., CHAIX, J., RUPP, L. J., WU, J., MADERA, S., SUN, J. C., LINDSTEN, T. & REINER, S. L. 2012. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*, 36, 55-67.
- GRANDA, T. G., CEBRIAN, D., MARTINEZ, S., ANGUITA, P. V., LOPEZ, E. C., LINK, W., MERINO, T., PASTOR, J., SERELDE, B. G., PEREGRINA, S., PALACIOS, I., ALBARRAN, M. I., CEBRIA, A., LORENZO, M., ALONSO, P., FOMINAYA, J., LOPEZ, A. R. & BISCHOFF, J. R. 2013. Biological characterization of ETP-46321 a selective and efficacious inhibitor of phosphoinositide-3-kinases. *Invest New Drugs*, 31, 66-76.
- GRANUCCI, F., ZANONI, I., PAVELKA, N., VAN DOMMELEN, S. L., ANDONIOU, C. E., BELARDELLI, F., DEGLI ESPOSTI, M. A. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2004. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med*, 200, 287-95.
- GREAVES, P. & GRIBBEN, J. G. 2013. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*, 121, 734-44.
- GUILLEREY, C., CHOW, M. T., MILES, K., OLVER, S., SCENEAY, J., TAKEDA, K., MOLLER, A. & SMYTH, M. J. 2015. Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *Oncoimmunology*, 4, e1027468.
- GUMBLETON, M. & KERR, W. G. 2013. Role of inositol phospholipid signaling in natural killer cell biology. *Front Immunol*, 4, 47.
- GUO, H., SAMARAKOON, A., VANHAESEBROECK, B. & MALARKANNAN, S. 2008. The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J Exp Med*, 205, 2419-35.
- HAYAKAWA, Y., HUNTINGTON, N. D., NUTT, S. L. & SMYTH, M. J. 2006. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev*, 214, 47-55.
- HAYAKAWA, Y. & SMYTH, M. J. 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol*, 176, 1517-24.
- HEDL, M., LAHIRI, A., NING, K., CHO, J. H. & ABRAHAM, C. 2014. Pattern recognition receptor signaling in human dendritic cells is enhanced by ICOS ligand and modulated by the Crohn's disease ICOSLG risk allele. *Immunity*, 40, 734-46.
- HUNTINGTON, N. D., VOSSHENRICH, C. A. & DI SANTO, J. P. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol*, 7, 703-14.



- HUTLOFF, A., DITTRICH, A. M., BEIER, K. C., ELJASCHEWITSCH, B., KRAFT, R., ANAGNOSTOPOULOS, I. & KROCZEK, R. A. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397, 263-6.
- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S. & STEINMAN, R. M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 176, 1693-702.
- ITO, T., YANG, M., WANG, Y. H., LANDE, R., GREGORIO, J., PERNG, O. A., QIN, X. F., LIU, Y. J. & GILLIET, M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*, 204, 105-15.
- JIANG, K., ZHONG, B., GILVARY, D. L., CORLISS, B. C., VIVIER, E., HONG-GELLER, E., WEI, S. & DJEU, J. Y. 2002. Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J Immunol*, 168, 3155-64.
- JINUSHI, M., TAKEHARA, T., KANTO, T., TATSUMI, T., GROH, V., SPIES, T., MIYAGI, T., SUZUKI, T., SASAKI, Y. & HAYASHI, N. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 170, 1249-56.
- KANEDA, H., TAKEDA, K., OTA, T., KADUKA, Y., AKIBA, H., IKARASHI, Y., WAKASUGI, H., KRONENBERG, M., KINOSHITA, K., YAGITA, H. & OKUMURA, K. 2005. ICOS costimulates invariant NKT cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 201-7.
- KERR, W. G. & COLUCCI, F. 2011. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. *J Innate Immun*, 3, 249-57.
- KIESSLING, R., KLEIN, E., PROSS, H. & WIGZELL, H. 1975a. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 5, 117-21.
- KIESSLING, R., KLEIN, E. & WIGZELL, H. 1975b. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5, 112-7.
- KIM, S., IIZUKA, K., KANG, H. S., DOKUN, A., FRENCH, A. R., GRECO, S. & YOKOYAMA, W. M. 2002. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol*, 3, 523-8.
- KLOSE, C. S., FLACH, M., MOHLE, L., ROGELL, L., HOYLER, T., EBERT, K., FABIUNKE, C., PFEIFER, D., SEXL, V., FONSECA-PEREIRA, D., DOMINGUES, R. G., VEIGA-FERNANDES, H., ARNOLD, S. J., BUSSLINGER, M., DUNAY, I. R., TANRIVER, Y. & DIEFENBACH, A. 2014. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, 157, 340-56.
- KLOSE, C. S., KISS, E. A., SCHWIERZECK, V., EBERT, K., HOYLER, T., D'HARGUES, Y., GOPPERT, N., CROXFORD, A. L., WAISMAN, A., TANRIVER, Y. & DIEFENBACH, A. 2013. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells. *Nature*, 494, 261-5.
- KOPF, M., COYLE, A. J., SCHMITZ, N., BARNER, M., OXENIUS, A., GALLIMORE, A., GUTIERREZ-RAMOS, J. C. & BACHMANN, M. F. 2000. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med*, 192, 53-61.

- KRZEWSKI, K. & STROMINGER, J. L. 2008. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 597-605.
- LAM, V. C. & LANIER, L. L. 2016. NK cells in host responses to viral infections. *Curr Opin Immunol*, 44, 43-51.
- LANIER, L. L. 2001. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol*, 2, 23-7.
- LEAVENWORTH, J. W., VERBINNEN, B., WANG, Q., SHEN, E. & CANTOR, H. 2015a. Intracellular osteopontin regulates homeostasis and function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 494-9.
- LEAVENWORTH, J. W., VERBINNEN, B., YIN, J., HUANG, H. & CANTOR, H. 2015b. A p85alpha-osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bcl-6 expression by follicular helper and regulatory T cells. *Nat Immunol*, 16, 96-106.
- LEAVY, O. 2013. Natural killer cells: adaptive control of NK cells. *Nat Rev Immunol*, 13, 394.
- LECOEUR, H., FEVRIER, M., GARCIA, S., RIVIERE, Y. & GOUGEON, M. L. 2001. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 253, 177-87.
- LIM, A. I., VERRIER, T., VOSSHENRICH, C. A. & DI SANTO, J. P. 2017. Developmental options and functional plasticity of innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol*, 44, 61-68.
- LIU, D., XU, H., SHIH, C., WAN, Z., MA, X., MA, W., LUO, D. & QI, H. 2015. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, 517, 214-8.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LONG, E. O., KIM, H. S., LIU, D., PETERSON, M. E. & RAJAGOPALAN, S. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, 31, 227-58.
- LUCAS, M., SCHACHTERLE, W., OBERLE, K., AICHELE, P. & DIEFENBACH, A. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 26, 503-17.
- MAAZI, H. & AKBARI, O. 2015. ICOS regulates ILC2s in asthma. *Oncotarget*, 6, 24584-5.
- MAAZI, H., PATEL, N., SANKARANARAYANAN, I., SUZUKI, Y., RIGAS, D., SOROOSH, P., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. & AKBARI, O. 2015. ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity*, 42, 538-51.
- MARCAIS, A., CHERFILS-VICINI, J., VIANI, C., DEGOUVE, S., VIEL, S., FENIS, A., RABILLOUD, J., MAYOL, K., TAVARES, A., BIENVENU, J., GANGLOFF, Y. G., GILSON, E., VIVIER, E. & WALZER, T. 2014. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nat Immunol*, 15, 749-57.
- MARTIN-OROZCO, N., LI, Y., WANG, Y., LIU, S., HWU, P., LIU, Y. J., DONG, C. & RADVANYI, L. 2010. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res*, 70, 9581-90.
- MARTINEZ GONZALEZ, S., HERNANDEZ, A. I., VARELA, C., RODRIGUEZ-ARISTEGUI, S., LORENZO, M., RODRIGUEZ, A., RIVERO, V., MARTIN, J. I., SALUSTE, C. G., RAMOS-LIMA, F., CENDON, E., CEBRIAN, D., AGUIRRE, E., GOMEZ-CASERO, E., ALBARRAN, M., ALFONSO, P., GARCIA-SERELDE, B., OYARZABAL, J., RABAL, O., MULERO, F., GONZALEZ-GRANDA, T., LINK, W., FOMINAYA, J., BARBACID, M., BISCHOFF, J.

- R., PIZCUETA, P. & PASTOR, J. 2012. Identification of ETP-46321, a potent and orally bioavailable PI3K alpha, delta inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 22, 3460-6.
- MARTINEZ, J., HUANG, X. & YANG, Y. 2008. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J Immunol*, 180, 1592-7.
- MCADAM, A. J., GREENWALD, R. J., LEVIN, M. A., CHERNOVA, T., MALENKOVICH, N., LING, V., FREEMAN, G. J. & SHARPE, A. H. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*, 409, 102-5.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. A., JR. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9, 4-9.
- MIYAKE, T., KUMAGAI, Y., KATO, H., GUO, Z., MATSUSHITA, K., SATOH, T., KAWAGOE, T., KUMAR, H., JANG, M. H., KAWAI, T., TANI, T., TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2009. Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 alpha+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J Immunol*, 183, 2522-8.
- MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., ABT, M. C., ALENGHAT, T., ZIEGLER, C. G., DOERING, T. A., ANGELOSANTO, J. M., LAIDLAW, B. J., YANG, C. Y., SATHALIYAWALA, T., KUBOTA, M., TURNER, D., DIAMOND, J. M., GOLDRATH, A. W., FARBER, D. L., COLLMAN, R. G., WHERRY, E. J. & ARTIS, D. 2011. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*, 12, 1045-54.
- MORETTA, L., BOTTINO, C., FERLAZZO, G., PENDE, D., MELIOLI, G., MINGARI, M. C. & MORETTA, A. 2003a. Surface receptors and functional interactions of human natural killer cells: from bench to the clinic. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2139-46.
- MORETTA, L., FERLAZZO, G., MINGARI, M. C., MELIOLI, G. & MORETTA, A. 2003b. Update on natural killer cells: cross-talk with dendritic cells and role in the cure of acute myeloid leukemias. *Cancer J*, 9, 232-7.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MOTTA, J. M. & RUMJANEK, V. M. 2016. Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals. *J Immunol Res*, 2016, 4753607.
- NA, H., CHO, M. & CHUNG, Y. 2016. Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune Netw*, 16, 1-12.
- NANDAGOPAL, N., ALI, A. K., KOMAL, A. K. & LEE, S. H. 2014. The Critical Role of IL-15-PI3K-mTOR Pathway in Natural Killer Cell Effector Functions. *Front Immunol*, 5, 187.
- NEWMAN, K. C. & RILEY, E. M. 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol*, 7, 279-91.
- NOTARIO, L., ALARI-PAHISSA, E., DE MOLINA, A. & LAUZURICA, P. 2016. CD69 Deficiency Enhances the Host Response to Vaccinia Virus Infection through Altered NK Cell Homeostasis. *J Virol*, 90, 6464-74.
- NURIEVA, R. I. 2005. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clin Immunol*, 115, 19-25.
- NURIEVA, R. I., TREUTING, P., DUONG, J., FLAVELL, R. A. & DONG, C. 2003. Inducible costimulator is essential for collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 111, 701-6.

- O'LEARY, J. G., GOODARZI, M., DRAYTON, D. L. & VON ANDRIAN, U. H. 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*, 7, 507-16.
- O'NEILL, L. A., GOLENBOCK, D. & BOWIE, A. G. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 453-60.
- O'SULLIVAN, T. E. & SUN, J. C. 2015. Generation of Natural Killer Cell Memory during Viral Infection. *J Innate Immun*, 7, 557-62.
- O'SULLIVAN, T. E., SUN, J. C. & LANIER, L. L. 2015. Natural Killer Cell Memory. *Immunity*, 43, 634-45.
- OCCHIPINTI, S., DIANZANI, C., CHIOCCHETTI, A., BOGGIO, E., CLEMENTE, N., GIGLIOTTI, C. L., SOLURI, M. F., MINELLI, R., FANTOZZI, R., YAGI, J., ROJO, J. M., SBLATTERO, D., GIOVARELLI, M. & DIANZANI, U. 2013. Triggering of B7h by the ICOS modulates maturation and migration of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 190, 1125-34.
- OGASAWARA, K., YOSHINAGA, S. K. & LANIER, L. L. 2002. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol*, 169, 3676-85.
- OJEDA, G., RONDA, M., BALLESTER, S., DIEZ-OREJAS, R., FEITO, M. J., GARCIA-ALBERT, L., ROJO, J. M. & PORTOLES, P. 1995. A hyperreactive variant of a CD4+ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. *Cell Immunol*, 164, 265-78.
- ORANGE, J. S. 2002. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*, 4, 1545-58.
- PACLIK, D., STEHLE, C., LAHMANN, A., HUTLOFF, A. & ROMAGNANI, C. 2015. ICOS regulates the pool of group 2 innate lymphoid cells under homeostatic and inflammatory conditions in mice. *Eur J Immunol*, 45, 2766-72.
- PEACH, R. J., BAJORATH, J., BRADY, W., LEYTZE, G., GREENE, J., NAEMURA, J. & LINSLEY, P. S. 1994. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med*, 180, 2049-58.
- PECK, A. B. & BACH, F. H. 1973. A miniaturized mouse mixed leukocyte culture in serum-free and mouse serum supplemented media. *J Immunol Methods*, 3, 147-63.
- PEDROS, C., ZHANG, Y., HU, J. K., CHOI, Y. S., CANONIGO-BALANCIO, A. J., YATES, J. R., 3RD, ALTMAN, A., CROTTY, S. & KONG, K. F. 2016. A TRAF-like motif of the inducible costimulator ICOS controls development of germinal center TFH cells via the kinase TBK1. *Nat Immunol*, 17, 825-33.
- PEDROZA-PACHECO, I., MADRIGAL, A. & SAUDEMONT, A. 2013. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol*, 10, 222-9.
- PERSSON CM, A. E., VAHLNE G, BRODIN P, CHAMBERS BJ. 2008. Critical role of Qa1b in the protection of mature dendritic cells from NK cell-mediated killing. *Scand J Immunol*, 6.
- PICCIOLI, D., SBRANA, S., MELANDRI, E. & VALIANTE, N. M. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*, 195, 335-41.

- PIKOVSKAYA, O., CHAIX, J., ROTHMAN, N. J., COLLINS, A., CHEN, Y. H., SCIPIONI, A. M., VIVIER, E. & REINER, S. L. 2016. Cutting Edge: Eomesodermin Is Sufficient To Direct Type 1 Innate Lymphocyte Development into the Conventional NK Lineage. *J Immunol*, 196, 1449-54.
- POWELL, N., WALKER, A. W., STOLARCZYK, E., CANAVAN, J. B., GOKMEN, M. R., MARKS, E., JACKSON, I., HASHIM, A., CURTIS, M. A., JENNER, R. G., HOWARD, J. K., PARKHILL, J., MACDONALD, T. T. & LORD, G. M. 2012. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. *Immunity*, 37, 674-84.
- PRASAD, K. V., CAI, Y. C., RAAB, M., DUCKWORTH, B., CANTLEY, L., SHOELSON, S. E. & RUDD, C. E. 1994. T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2834-8.
- PYZIK, M., CHARBONNEAU, B., GENDRON-PONTBRIAND, E. M., BABIC, M., KRMPOTIC, A., JONJIC, S. & VIDAL, S. M. 2011a. Distinct MHC class I-dependent NK cell-activating receptors control cytomegalovirus infection in different mouse strains. *J Exp Med*, 208, 1105-17.
- PYZIK, M., GENDRON-PONTBRIAND, E. M. & VIDAL, S. M. 2011b. The impact of Ly49-NK cell-dependent recognition of MCMV infection on innate and adaptive immune responses. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 641702.
- RANKIN, L. C., GROOM, J. R., CHOPIN, M., HEROLD, M. J., WALKER, J. A., MIELKE, L. A., MCKENZIE, A. N., CAROTTA, S., NUTT, S. L. & BELZ, G. T. 2013. The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat Immunol*, 14, 389-95.
- REDOGLIA, V., DIANZANI, U., ROJO, J. M., PORTOLES, P., BRAGARDO, M., WOLFF, H., BUONFIGLIO, D., BONISSONI, S. & JANEWAY, C. A., JR. 1996. Characterization of H4: a mouse T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/T cell receptor. *Eur J Immunol*, 26, 2781-9.
- REYNOLDS, G. & HANIFFA, M. 2015. Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species? *Front Immunol*, 6, 330.
- ROJO, J. & PORTOLES, P. 2014. Class I phosphoinositide 3-kinases in immunity: effect of inhibitors in immune and autoimmune reactions. *An Real Acad Far*, 80, 91-125.
- ROJO, J. M., PINI, E., OJEDA, G., BELLO, R., DONG, C., FLAVELL, R. A., DIANZANI, U. & PORTOLES, P. 2008. CD4+ICOS+ T lymphocytes inhibit T cell activation 'in vitro' and attenuate autoimmune encephalitis 'in vivo'. *Int Immunol*, 20, 577-89.
- ROJO, J. M., PORTOLES, P., YAGI, J. & DIANZANI, U. 2001. H4/ICOS: a costimulatory protein in the right place at the right time? *Inmunología*, 20, 196-206.
- ROTTMAN, J. B., SMITH, T., TONRA, J. R., GANLEY, K., BLOOM, T., SILVA, R., PIERCE, B., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., OZKAYNAK, E. & COYLE, A. J. 2001. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*, 2, 605-11.
- RUDD, C. E. & SCHNEIDER, H. 2003. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 3, 544-56.

- RUDD, C. E., TAYLOR, A. & SCHNEIDER, H. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*, 229, 12-26.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*, 177, 134-40.
- SAUER, K., PARK, E., SIEGEMUND, S., FRENCH, A. R., WAHLE, J. A., STERNBERG, L., RIGAUD, S., JONSSON, A. H., YOKOYAMA, W. M. & HUANG, Y. H. 2013. Inositol tetrakisphosphate limits NK cell effector functions by controlling PI3K signaling. *Blood*, 121, 286-97.
- SCHMIDT, K. N., LEUNG, B., KWONG, M., ZAREMBER, K. A., SATYAL, S., NAVAS, T. A., WANG, F. & GODOWSKI, P. J. 2004. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol*, 172, 138-43.
- SERAFINI, N., VOSSHENRICH, C. A. & DI SANTO, J. P. 2015. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*, 15, 415-28.
- SHARPE, A. H. & FREEMAN, G. J. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2, 116-26.
- SIMONETTA, F., PRADIER, A. & ROOSNEK, E. 2016. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Front Immunol*, 7, 241.
- SIMPSON, T. R., QUEZADA, S. A. & ALLISON, J. P. 2010. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr Opin Immunol*, 22, 326-32.
- SITNICKA, E. 2011. Early cellular pathways of mouse natural killer cell development. *J Innate Immun*, 3, 329-36.
- SIVORI, S., CARLOMAGNO, S., PESCE, S., MORETTA, A., VITALE, M. & MARCENARO, E. 2014. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol*, 5, 105.
- SO, L. & FRUMAN, D. A. 2012. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem J*, 442, 465-81.
- SOJKA, D. K., PLOUGASTEL-DOUGLAS, B., YANG, L., PAK-WITTEL, M. A., ARTYOMOV, M. N., IVANOVA, Y., ZHONG, C., CHASE, J. M., ROTHMAN, P. B., YU, J., RILEY, J. K., ZHU, J., TIAN, Z. & YOKOYAMA, W. M. 2014. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife*, 3, e01659.
- SPITS, H., BERNINK, J. H. & LANIER, L. 2016. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol*, 17, 758-64.
- STEINMAN, R. M., HAWIGER, D., LIU, K., BONIFAZ, L., BONNYAY, D., MAHNKE, K., IYODA, T., RAVETCH, J., DHODAPKAR, M., INABA, K. & NUSSENZWEIG, M. 2003a. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 987, 15-25.
- STEINMAN, R. M., HAWIGER, D. & NUSSENZWEIG, M. C. 2003b. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 685-711.
- STOJANOVIC, A., FIEGLER, N., BRUNNER-WEINZIERL, M. & CERWENKA, A. 2014. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN-gamma production in response to mature dendritic cells. *J Immunol*, 192, 4184-91.



- STRAUSS, L., BERGMANN, C., SZCZEPANSKI, M. J., LANG, S., KIRKWOOD, J. M. & WHITESIDE, T. L. 2008. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol*, 180, 2967-80.
- SWALLOW, M. M., WALLIN, J. J. & SHA, W. C. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF $\alpha$ . *Immunity*, 11, 423-32.
- TAKAHASHI, N., MATSUMOTO, K., SAITO, H., NANKI, T., MIYASAKA, N., KOBATA, T., AZUMA, M., LEE, S. K., MIZUTANI, S. & MORIO, T. 2009. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol*, 182, 5515-27.
- TAKEDA, K., CRETNEY, E., HAYAKAWA, Y., OTA, T., AKIBA, H., OGASAWARA, K., YAGITA, H., KINOSHITA, K., OKUMURA, K. & SMYTH, M. J. 2005. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood*, 105, 2082-9.
- TANG, G., QIN, Q., ZHANG, P., WANG, G., LIU, M., DING, Q., QIN, Y. & SHEN, Q. 2009. Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells. *Cell Mol Life Sci*, 66, 3067-80.
- THOMAS, R. & YANG, X. 2016. NK-DC Crosstalk in Immunity to Microbial Infection. *J Immunol Res*, 2016, 6374379.
- TOWNSEND, M. J., WEINMANN, A. S., MATSUDA, J. L., SALOMON, R., FARNHAM, P. J., BIRON, C. A., GAPIN, L. & GLIMCHER, L. H. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*, 20, 477-94.
- VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, 44-9.
- VU MANH, T. P., BERTHO, N., HOSMALIN, A., SCHWARTZ-CORNIL, I. & DALOD, M. 2015. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol*, 6, 260.
- WALKER, J. A., BARLOW, J. L. & MCKENZIE, A. N. 2013. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*, 13, 75-87.
- WANG, S. & CHEN, L. 2004a. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect*, 6, 759-66.
- WANG, S. & CHEN, L. 2004b. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol*, 1, 37-42.
- WANG, S., ZHU, G., CHAPOVAL, A. I., DONG, H., TAMADA, K., NI, J. & CHEN, L. 2000. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood*, 96, 2808-13.
- WATANABE, M., TAKAGI, Y., KOTANI, M., HARA, Y., INAMINE, A., HAYASHI, K., OGAWA, S., TAKEDA, K., TANABE, K. & ABE, R. 2008. Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses. *J Immunol*, 180, 5222-34.
- WIKENHEISER, D. J. & STUMHOFER, J. S. 2016. ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Front Immunol*, 7, 304.
- WU, X., CHEN, Y., WEI, H., SUN, R. & TIAN, Z. 2012. Development of murine hepatic NK cells during ontogeny: comparison with spleen NK cells. *Clin Dev Immunol*, 2012, 759765.
- XU, H., LI, X., LIU, D., LI, J., ZHANG, X., CHEN, X., HOU, S., PENG, L., XU, C., LIU, W., ZHANG, L. & QI, H. 2013. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*, 496, 523-7.

- YAO, S., ZHU, Y., ZHU, G., AUGUSTINE, M., ZHENG, L., GOODE, D. J., BROADWATER, M., RUFF, W., FLIES, S., XU, H., FLIES, D., LUO, L., WANG, S. & CHEN, L. 2011. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity*, 34, 729-40.
- YONG, P. F., SALZER, U. & GRIMBACHER, B. 2009. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev*, 229, 101-13.
- YOSHINAGA, S. K., WHORISKEY, J. S., KHARE, S. D., SARMIENTO, U., GUO, J., HORAN, T., SHIH, G., ZHANG, M., COCCIA, M. A., KOHNO, T., TAFURI-BLADT, A., BRANKOW, D., CAMPBELL, P., CHANG, D., CHIU, L., DAI, T., DUNCAN, G., ELLIOTT, G. S., HUI, A., MCCABE, S. M., SCULLY, S., SHAHINIAN, A., SHAKLEE, C. L., VAN, G., MAK, T. W. & SENALDI, G. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402, 827-32.
- 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, 2375-80.
- ZHANG, C. & TIAN, Z. 2017. NK cell subsets in autoimmune diseases. *J Autoimmun*.
- ZHANG, C., ZHANG, J. & TIAN, Z. 2006. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol Immunol*, 3, 241-54.
- ZHU, J., MARTINEZ, J., HUANG, X. & YANG, Y. 2007. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood*, 109, 619-25.
- ZIMMER, J., ANDRES, E. & HENTGES, F. 2008. NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek. *Eur J Immunol*, 38, 2942-5.
- ZOOK, E. C. & KEE, B. L. 2016. Development of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 17, 775-82.



Anexo

## 10. Anexo

### Publicaciones derivadas de la realización de la tesis

**Montes-Casado M.**, Ojeda G., Aragoneses-Fenoll L., Perez-Crespo M., Rojo J.M., Portolés P. "ICOS (CD278) is required for maturation and homeostasis of NK cells". En preparación.

Aragoneses-Fenoll, L., **M. Montes-Casado**, G. Ojeda, Y. Y. Acosta, J. Herranz, S. Martinez, C. Blanco-Aparicio, G. Criado, J. Pastor, U. Dianzani, P. Portoles, and J. M. Rojo. "ETP-46321, a Dual P110alpha/Delta Class IA Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor Modulates T Lymphocyte Activation and Collagen-Induced Arthritis." *Biochem Pharmacol* 106, (2016): 56-69.

Acosta, Y. Y., **M. Montes-Casado**, L. Aragoneses-Fenoll, U. Dianzani, P. Portoles, and J. M. Rojo. "Suppression of Cd4+ T Lymphocyte Activation *in Vitro* and Experimental Encephalomyelitis *in vivo* by the Phosphatidyl Inositol 3-Kinase Inhibitor PIK-75." *Int J Immunopathol Pharmacol* 27, no. 1 (2014): 53-67.

### Otras publicaciones durante la realización de la tesis

Aragoneses-Fenoll, L., G. Ojeda, **Montes-Casado M**, Y. Y. Acosta, Criado, J. Pastor, U. Dianzani, P. Portoles, and J. M. Rojo. T-cell specific loss of Class IA PI-3 kinase p110- $\alpha$  catalytic subunits: Impact in T cell-function and humoral and tumor responses. Enviado a *Cancer Immunology Research*.

Cicuéndez M., Portolés P., **Montes-Casado M.**, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí y M.T. Portolés. "Effects of 3D nanocomposite bioceramic scaffolds on the immune response". *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 2, 3469–3479.

Rojo, J. M., G. Ojeda, Y. Y. Acosta, **Montes-Casado M.**, G. Criado, and P. Portoles. "Characteristics of Tcr/Cd3 Complex CD3 $\zeta$  Chains of Regulatory CD4+ T (Treg) Lymphocytes: Role in Treg Differentiation *in Vitro* and Impact on Treg *in vivo*." *J Leukoc Biol* 95, no. 3 (2014): 441-50.

Ojeda, G., E. Pini, C. Eguiluz, **M. Montes-Casado**, F. Broere, W. van Eden, J. M. Rojo, and P. Portoles. "Complement Regulatory Protein Crry/P65 Costimulation Expands Natural Treg Cells with Enhanced Suppressive Properties in Proteoglycan-Induced Arthritis." *Arthritis Rheum* 63, no. 6 (2011): 1562-72.

Abstracts derivados de presentaciones en congresos

- Laura Aragoneses-Fenoll, Lucía García-Paredes, **María Montes-Casado**, Gloria Ojeda, Pablo Wagener, Umberto Dianzani, Pilar Portolés, Jose María Rojo. Mechanisms of ICOS Ligand (ICOS-L, B7h, CD275) ICOS-dependent downmodulation. Role of raft-dependent endocytosis. XL CONGRESO NACIONAL SEI. Zaragoza. 2017.
- **Montes-Casado, María**; Aragoneses-Fenoll, Laura; Ojeda, Gloria; Acosta, Yennyb; Dianzani, Umberto; Rojo, José M.b; Portolés, Pilara T-cell specific depletion of Class IA PI-3 kinase p110 $\alpha$  catalytic subunits favors Th1 differentiation. Effect on antigen- and melanoma-specific responses. XXXIX CONGRESO NACIONAL SEI Alicante 2016
- **Maria Montes-Casado**, Laura Aragoneses-Fenoll, Gloria Ojeda, Yenny Y. Acosta, Sonia Martínez, Carmen Blanco-Aparicio, Joaquín Pastor, Gabriel Criado, Umberto Dianzani, Jose M. Rojo, Pilar Portolés , Inhibition of class IA phosphoinositide 3-kinases p110 $\alpha$  and p110 $\delta$  by ETP-46321 modulates T lymphocyte activation "in vitro" and collagen-induced arthritis. SICAM 2015
- P. Portolés, G. Ojeda, Y.Y. Acosta, **M. Montes-Casado**, G. Criado, J.M. Rojo. Characteristics of TCR/CD3-complex CD3 $\epsilon$  chains of regulatory CD4+T (Treg) lymphocytes. Role in Treg differentiation *in vitro* and impact on Treg *in vivo*. EMBO Conference " Lymphocyte signalling". Bertinoro (Italia) 2014.
- Jose M. Rojo, Laura Aragoneses-Fenoll, **María Montes-Casado**, YennyY. Acosta, Jorge Herranz, Sonia Martínez, Carmen Blanco-Aparicio, Joaquín Pastor, Umberto Dianzani, Pilar Portolés, CD28 and ICOS signaling: Studies on the role of class IA PI3 kinase p110 $\alpha$ and p110 $\delta$  subunits using specific single or dual inhibitors. EMBO Conference " Lymphocyte signalling". Bertinoro (Italia) 2014.
- Laura Aragoneses-Fenoll, **María Montes-Casado**, YennyY. Acosta, Jorge Herranz, Sonia Martínez, Carmen Blanco-Aparicio, Joaquín Pastor, Umberto Dianzani, Pilar Portolés, Jose M. Rojo. CD28 and ICOS signaling in T cells: Studies on the role of class IA PI3 kinase p110 $\alpha$ and p110 $\delta$  subunits using specific single inhibitors or the dual inhibitor ETP-46321. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Badajoz 2014.
- J.M. Rojo, Y.Y. Acosta, L. Aragoneses, **M. Montes**, J. Herranz and P. Portolés. Class IA PI3 kinase p110 $\alpha$  and p110 $\delta$  catalytic subunits in T cell activation: effect of specific inhibitors on CD28 and ICOS costimulation and lymphocyte survival. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. Salamanca 2013.
- J.M. Rojo, **M. Montes-Casado**, Y.Y. Acosta, G. Ojeda, G. Criado and P. Portolés. Characteristics of CD3 $\epsilon$  chains and TCR/CD3 signalling molecules in regulatory CD4+ T (Treg) lymphocytes: Impact of CD3 $\epsilon$  chain isoforms in induced Treg differentiation in vitro and on Treg in vivo. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. Salamanca 2013.

- **M. Montes-Casado**, G. Ojeda, J.M. Rojo, G. Criado and P. Portolés. Characteristics of CD3e chains and TCR/CD3 signalling molecules in regulatory CD4+ T (Treg) lymphocytes: Impact of CD3e chain isoforms in induced Treg differentiation in vitro and on Treg in vivo. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. Salamanca 2013.
- M. Montes- Casado, G. Ojeda Villarroya, E. Pini Neder-Vivot, J.M. Rojo Hernandez y P. Portolés Pérez. Implicacion de ICOS en la Homeostasis de Subpoblaciones linfoides. XXXVI Congreso de la Sociedad Española Inmunología. Pamplona 2012.