

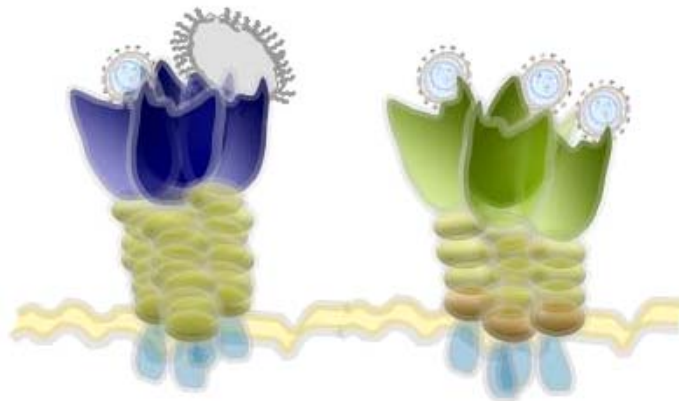
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I



Regulación de la expresión y función de las lectinas mieloides DC-SIGN y LSECtin



TESIS DOCTORAL

Angeles Domínguez Soto

Madrid, 2008



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I



**Regulación de la expresión y
función de las lectinas mieloides
DC-SIGN y LSEctin**

TESIS DOCTORAL

Angeles Domínguez Soto

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I

Regulación de la expresión y función de las lectinas mieloides DC-SIGN y LSEctin

Este trabajo ha sido realizado por Angeles Domínguez Soto para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), bajo la dirección del Dr. Ángel Luis Corbí López.

Fdo. Dr. Ángel Luis Corbí López



A Javi,

A mis hermanos y mis padres

A Angel por transmitirme
la *pasión* por la ciencia

A Todos los que de verdad
me han ayudado a llegar hasta aquí

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÉLULAS DENDRÍTICAS	7
1.1 Inmunidad innata y adaptativa	7
1.2 Células dendríticas: características y ciclo	8
2. PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS Y SUS RECEPTORES	10
2.1 Receptores tipo <i>Toll</i> (TLR).....	12
2.2 Familia de proteínas NLRs: NODs y NALPs	14
3. RECEPTORES LECTINA TIPO C (CLR)	15
3.1 Determinantes estructurales en las lectinas tipo C	17
3.2 Lectinas tipo c en células dendríticas	18
3.3 Actividades funcionales de las lectinas tipo C en células dendríticas ..	20
3.4 Grupos de lectinas tipo C en células dendríticas	23
3.4.1 Lectinas codificadas en el cromosoma 2: LANGERINA Y DEC-205	23
3.4.2 Lectinas codificadas en el cromosoma 10: RECEPTOR DE MANOSA.....	25
3.4.3 Lectinas codificadas en el cromosoma 12: LECTINAS DEPENDIENTES (DCIR) E INDEPENDIENTES (DECTIN-1) DE CALCIO	26
3.4.4 Lectinas codificadas en el cromosoma 17: MGL	28
3.4.5 Lectinas codificadas en el cromosoma 19	28
4. LSECtin	31
5. DC-SIGN	33
5.1 Expresión, estructura y función	33
5.2 Homólogos murinos de DC-SIGN	37

5.3 Región reguladora proximal del gen de DC-SIGN y polimorfismos asociados.....	39
OBJETIVOS	41
RESULTADOS	45
1. LSECtin MEDIA CAPTURA ANTIGÉNICA Y UNIÓN DE PATÓGENOS EN CÉLULAS MIELOIDES HUMANAS.....	49
2. LSECtin ESTÁ PRESENTE EN CÉLULAS MIELOIDES HEPÁTICAS Y SU EXPRESIÓN ESTÁ REGULADA POR PU.1	61
3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA DE DC-SIGN EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	89
DISCUSIÓN	101
1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DC-SIGN	101
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LSECtin	109
3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LSECtin	112
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO	141

ABREVIATURAS

Gran parte de las abreviaturas y acrónimos empleados en la presente Tesis proceden del inglés y como tal se han mantenido:

ADAM	A disintegrin and metalloprotease
APC	Célula presentadora de antígeno
BDCA	Blood dendritic cell antigen 2 protein
CCL	Chemokine (CC motif) ligand
CD	Cluster of differentiation
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CLEC	C-type lectin domain
CLR	C-type lectin receptor
DC	Célula dendrítica
DCAL	Dendritic-cell-associated C-type lectin
DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin
DC-SIGNR	DC-SIGN related
Dectin	Dendritic cell-associated C-type lectin
Der p 1	Alérgeno principal de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ERK	Extracellular-signal regulated protein kinase
GalNAc	N-Acetil-Galactosamina
GlnNAc	N-Acetil-Glucosamina
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP	Glicoproteína
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
ITAM	Tyrosine-based activation motif
ITIM	Tyrosine-based inhibitory motif
IκB	Inhibidor de NF κ B
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus kinase
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor-1
LSEctin	Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBL	Mannose-binding lectin
MGL	Macrophage galactose lectin

MHC	Major histocompatibility complex
MyD88	Factor 88 de diferenciación mieloide
NALP	NATCH-, LRR-, and pyrin domain-containing protein
NFκB	Factor nuclear kappa de células B
NLR	NATCH-LRR
Nod	Nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PGN	Peptidoglicano
PLC	Fosfolipasa C
PRR	Pathogen recognition receptor
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAK	Transforming growth factor-beta-activated kinase
TCR	T cell receptor
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

1.1 INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

El ser humano se encuentra expuesto constantemente a microorganismos y agentes extraños presentes en el ambiente o en su propio cuerpo. El sistema inmunitario es el responsable de realizar la difícil tarea de discriminar lo propio de lo extraño y potencialmente dañino, así como de actuar apropiadamente para eliminar dichos agentes sin dañar los tejidos propios.

El sistema inmunitario comprende el sistema innato o natural y el sistema adaptativo o específico, y la coordinación de ambas respuestas permite llevar a cabo su función defensiva de modo eficiente. El sistema innato proporciona la primera línea de defensa frente a organismos extraños, previniendo la infección y en algunos casos llegando a la eliminación del microorganismo. Este sistema, presente en la mayoría de los organismos multicelulares [1], incluye componentes celulares y moleculares que representan mecanismos de resistencia no específicos de antígeno, y entre los que se encuentran la barrera epitelial, células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas), proteínas efectoras circulantes (sistema del complemento, colectinas, proteína C reactiva) y citoquinas. El sistema adaptativo es una ventaja evolutiva desarrollada en vertebrados, principalmente en mamíferos, que supone una herramienta más sofisticada para hacer frente a los microorganismos que escapan a la respuesta innata. Este sistema se caracteriza por ser antígeno-específico y otorgar memoria inmunológica al organismo, lo que le permite responder más eficientemente frente a exposiciones repetidas de un mismo agente. La respuesta inmunitaria adaptativa incluye componentes humorales (anticuerpos) y celulares (linfocitos T), y sus niveles relativos dependen de la naturaleza del microorganismo. En consecuencia, las respuestas innata y adaptativa son componentes de un sistema integrado de defensa del organismo. Existen dos importantes conexiones entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. En primer lugar, la respuesta innata tiene efecto sobre la respuesta inmune adaptativa e influye y determina la naturaleza de esta última. Por otra parte, la respuesta adaptativa emplea muchos de los mecanismos efectoras de la inmunidad innata para eliminar el microorganismo, modulando sus actividades antimicrobianas. Las células dendríticas (DC) y los macrófagos son los mayores exponentes de dichas conexiones.

1.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS: CARACTERÍSTICAS Y CICLO VITAL

Las células dendríticas (DC) se identificaron por primera vez en 1868 en la epidermis, donde reciben el nombre de células de Langerhans. En un principio fueron consideradas parte del sistema nervioso, y no fue hasta 1973 cuando Steinman y Cohn las describieron en otros tejidos y denominaron células dendríticas [2]. Las DC son células derivadas de médula ósea que actúan como células presentadoras de antígenos (APC) y, por tanto, poseen la capacidad exclusiva de iniciar la respuesta inmunitaria y relacionar las respuestas innata y adaptativa [3, 4]. Las DC se encuentran distribuidas por todo el organismo, aunque en un número y proporción tan bajo que imposibilitó su estudio hasta que no se desarrollaron técnicas para su generación y cultivo *in vitro* a partir de progenitores CD34+ de médula ósea o monocitos [5]. El tratamiento de monocitos humanos CD14+ con GM-CSF e IL-4 [6] da lugar a células con fenotipo característico de dendríticas inmaduras. La relevancia fisiológica de la diferenciación de monocito a célula dendrítica *in vitro* ha sido corroborada *in vivo* al demostrarse que los monocitos inflamatorios transportan partículas fagocitadas a los nódulos linfáticos, donde adquieren características funcionales de células dendríticas [7, 8].

Como centinelas del sistema inmune, las DC expresan una gran cantidad de receptores especializados en reconocimiento de patógenos y captura de antígenos, lo cual les permite muestrear constantemente el medio que les rodea en busca de "señales de peligro". Además, las DC tienen la capacidad de activar y polarizar a los linfocitos T vírgenes y, dependiendo de su estado de maduración, promover la tolerancia inmunológica o respuesta inmunitaria [9, 10]. Esta ambivalencia funcional ha llevado a la célula dendrítica a ser el foco de atención de protocolos de inmunoterapia en enfermedades autoinmunes, cáncer o trasplante [11].

La capacidad de las DC de activar a los linfocitos T vírgenes las diferencia del resto de células presentadoras de antígeno, y es la razón por la que se les denomina APCs profesionales. Las DC tienen la capacidad de controlar el tipo de respuesta inmunitaria que se genera frente a un antígeno, determinando si los linfocitos T vírgenes han de polarizarse hacia Th1, Th2, Th17 o T reguladoras [4]. Los linfocitos Th1 son efectivos frente a patógenos intracelulares, ya que el IFN- γ que producen estimula mecanismos antimicrobianos en macrófagos y células infectadas, mientras que los Th2 (productores de IL-4) son más efectivos en la eliminación de patógenos extracelulares. Este proceso de polarización es de gran relevancia, por cuanto los patógenos pueden manipularla, interferir en el balance Th1/Th2 y, por tanto, perjudicar la generación de una respuesta inmunitaria efectiva.

Ciclo Vital de las células dendríticas

Las células dendríticas son comúnmente clasificadas en dos clases fenotípicas según su grado de parentesco con los linajes mejor definidos [12]: DC mieloides (convencionales), con un fenotipo prototípico CD11c+/CD123-, y DC plasmacitoides (productoras de interferón) definidas por un fenotipo CD11c-/CD123+ [13]. En el caso de las DC mieloides, sus progenitores salen de la médula ósea, entran en la circulación y posteriormente llegan a los tejidos periféricos, donde se convierten en DC inmaduras. Las DC reciben distintos nombres según su localización (células de Langerhans, DC intersticiales, DC dérmicas, DC tímicas,...). En este estadio, las DC expresan gran cantidad de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), lo que las dota de una gran capacidad para detectar “señales de peligro” [14]. La alta capacidad endocítica que presentan estas células les permite capturar y procesar eficientemente los antígenos presentes en el medio extracelular [14]. En este estadio las DC contribuyen al establecimiento de la tolerancia periférica [10]. Sin embargo, las DC inmaduras son extremadamente sensibles a la presencia de patógenos, productos derivados de patógenos o moléculas propias alteradas (“señales de peligro”), que disparan drásticos cambios transcripcionales, morfológicos y funcionales en ellas. Este proceso se ha denominado “maduración” [8, 9] y es clave en la generación de respuestas inmunitarias antígeno-específicas. Aunque se ha demostrado la existencia de un “core” de genes regulados en presencia de cualquier patógeno o estímulo inflamatorio, la maduración de DC es un proceso patógeno-específico, por cuanto el conjunto de cambios génicos que tiene lugar es único y exclusivo para cada patógeno [15]. El nuevo fenotipo de las células dendríticas maduras les permite presentar los antígenos anteriormente capturados y procesados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [9, 16]. Algunos de los cambios experimentados en el proceso de maduración incluyen la disminución de receptores implicados en captura de antígeno y capacidad endocítica, el aumento de los niveles de moléculas coestimuladoras y MHC, el aumento de la expresión de citoquinas polarizadoras (IL-10, IL-23, IL12p70), la disminución en los niveles de expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias y el aumento de la capacidad migratoria en respuesta a quimioquinas como CCL19 y CCL21 [9]. Simultáneamente al proceso de maduración tiene lugar la migración de las células dendríticas hacia los órganos linfoides secundarios, donde promoverán la activación y polarización de linfocitos T vírgenes, orquestándose así la respuesta inmunitaria adaptativa [9, 17, 18] (**Figura 1**).

En resumen, tras el comienzo de un proceso infeccioso, las células dendríticas inmaduras detectan el “peligro” y sufren una reprogramación de su perfil de expresión génica de manera patógeno-específica (maduración). Este proceso de maduración les permitirá promover la

polarización de los linfocitos T vírgenes y, por tanto, iniciar la respuesta inmunitaria más efectiva frente a ese microorganismo concreto [15, 19, 20].

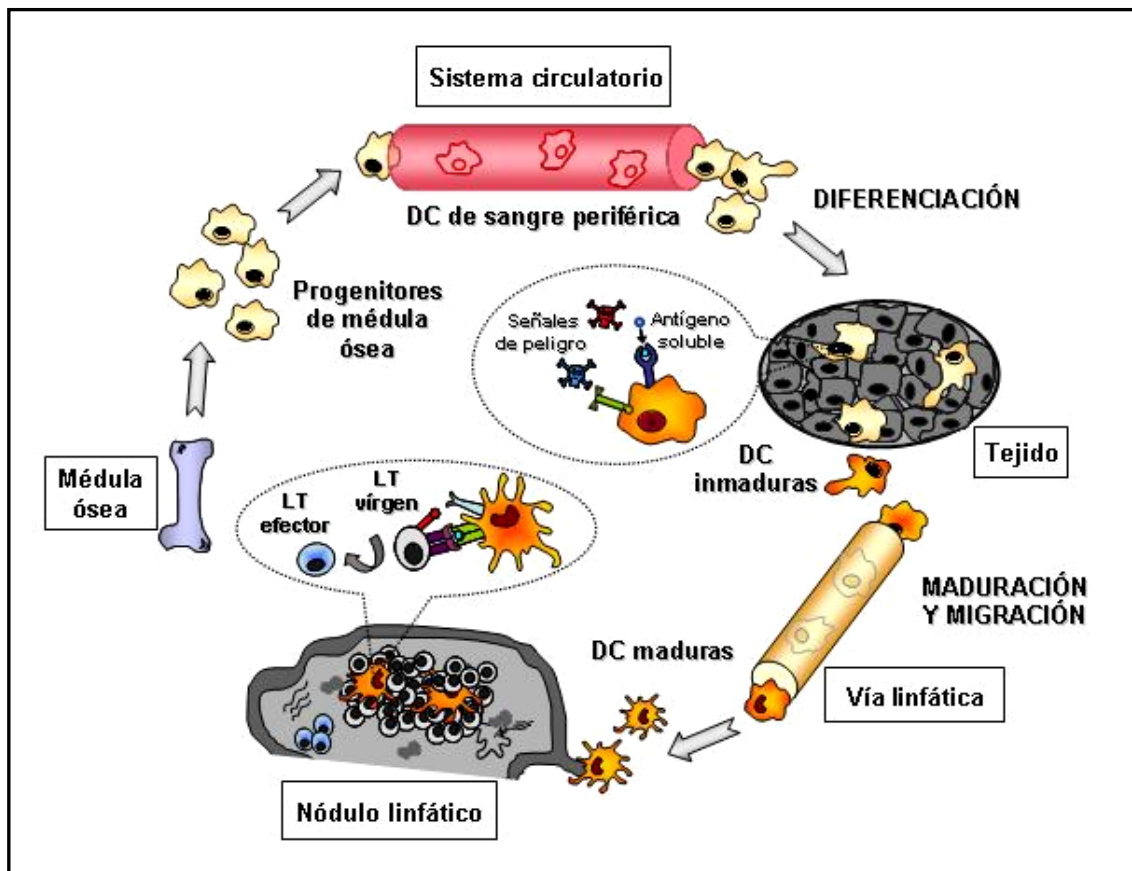


Figura 1.- Ciclo vital de las células dendríticas. Las DCs se diferencian a partir de progenitores de médula ósea y, una vez en los tejidos (DC inmaduras) reciben señales que promueven su maduración y migración a los ganglios linfáticos, donde van a determinar el tipo de respuesta inmune que se desencadenará (ver texto para más detalles) (DC, célula dendrítica; LT, linfocito T).

2. PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS Y SUS RECEPTORES

La detección de material patógeno llevada a cabo por el sistema inmunitario innato es consecuencia de la capacidad de macrófagos y células dendríticas de reconocer estructuras moleculares conservadas presentes en la superficie de los organismos patógenos. Estas moléculas altamente conservadas en la escala evolutiva del microorganismo, no presentes en organismos superiores e indispensables para la viabilidad del microorganismos, son conocidas como "Patrones Moleculares Asociados a Patógenos" (PAMP) [21]. Estas características tan particulares de los PAMP permiten al sistema inmunitario actuar fácilmente, ya que se distinguen de lo propio, y economizar, puesto que basta un número reducido de receptores

para la detección de un amplio espectro de patógenos. Estas características de los PAMP también posibilitan al sistema inmunitario actuar con efectividad desde el principio, ya que no es posible la modificación de estos PAMPs para intentar escapar del huésped debido a su importancia en la viabilidad del microorganismo. Los determinantes moleculares reconocidos por las células del huésped se localizan en carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos bacterianos y virales, siendo algunos de estos PAMPs el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, el ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram-positivas y el RNA de doble cadena de los virus [22].

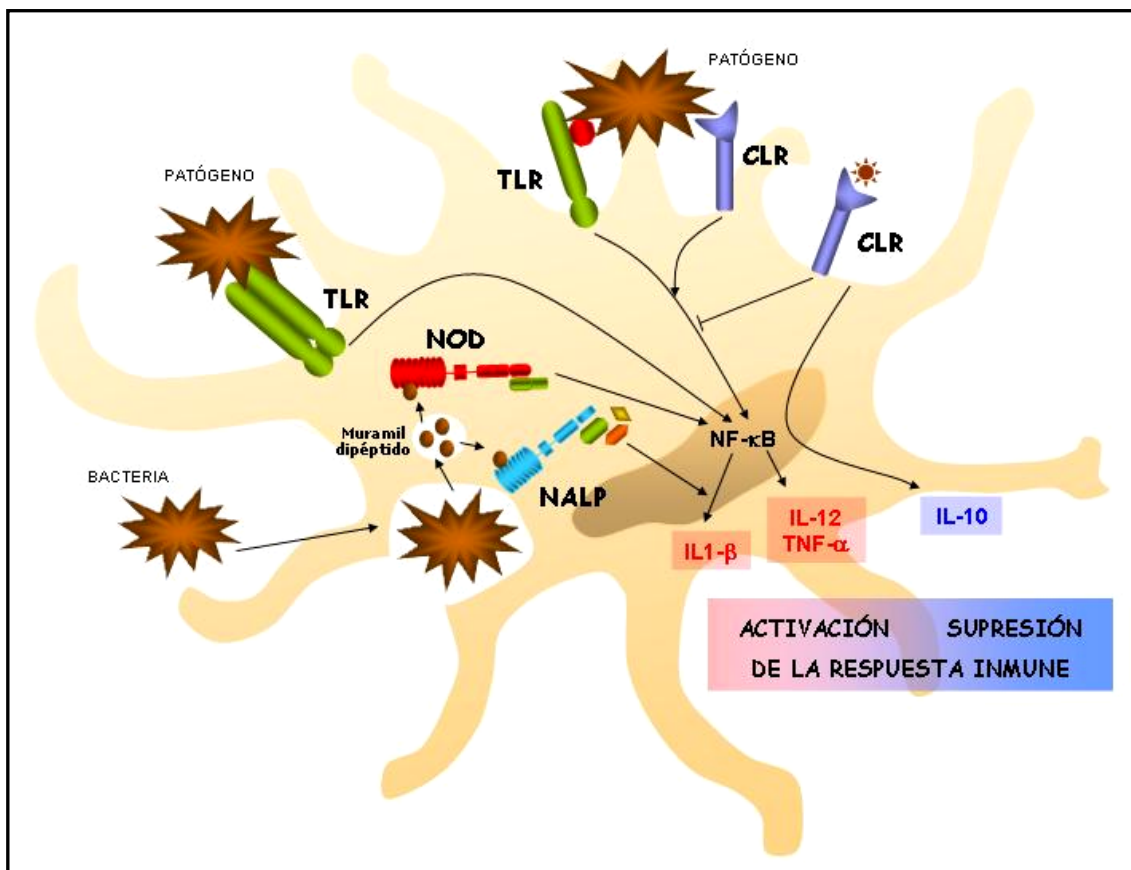


Figura 2.- Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR). Modelo donde se presentan los distintos receptores de reconocimiento de patógenos (TLR, NLR y CLR) y sus posibles acciones sobre la respuesta inmune.

El reconocimiento de este conjunto de moléculas consideradas como “señales de peligro”, así como de moléculas propias alteradas, se consigue a través de la expresión de receptores conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR). Los organismos superiores cuentan con diferentes tipos de estos receptores, entre los que destacan los “Toll-Like Receptor” (TLR) [23, 24], la familia NACHT-LRR (NLR), que incluye los grupos de receptores NOD (nucleotide-binding oligomerization domains) [25, 26] y NALPs (NACHT-, LRR- and pyrin domain (PYD)-containing proteins), y las lectinas dependiente de Ca^{2+} (CLR) (**Figura 2**).

Los Receptores de Reconocimiento de Patógenos son un componente clave del sistema inmune y están implicados en los mecanismos efectores de la respuesta innata, así como en la activación de la inmunidad adaptativa [27].

2.1 RECEPTORES TIPO *Toll* (TLR)

Los receptores tipo *Toll* están conservados evolutivamente y son homólogos a los encontrados en plantas, insectos y vertebrados. El primer miembro de esta familia, denominado *Toll* e identificado en *Drosophila melanogaster* [28], es responsable del desarrollo embrionario dorsoventral de la mosca de la fruta y juega un papel importante en la protección frente a hongos en la fase adulta de la mosca [29, 30]. Los TLRs son los homólogos en mamíferos de *Toll* y se han descrito 11 genes en humanos y 13 en ratón [31]. Los TLRs presentan una amplia distribución tisular, y aunque todos los tejidos expresan al menos uno de estos receptores, son las células del sistema inmunitario las que presentan una mayor variedad y niveles de expresión de TLR [32]. Los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I caracterizadas por un dominio extracelular rico en leucinas (LRR) y un dominio citoplásmico llamado TIR (receptor *Toll*/IL1) homólogo al del receptor de IL-1 e implicado en señalización [33]. El dominio LRR contiene repeticiones en tándem de 24-29 aminoácidos responsables del reconocimiento de PAMPs bacterianos, víricos, fúngicos o de parásitos [34]. Los TLRs se clasifican en tres grupos en función del tipo de PAMP que reconocen. TLR1, 2, 4 y 6 reconocen lípidos. TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas. TLR2 forma heterodímeros con TLR1, TLR6 y otros no-TLR como CD36 para reconocer y discriminar entre una gran variedad de PAMPs, como el peptidoglicano (PGN), lipoproteínas de bacterias Gram-positivas, lipopéptidos de micoplasma y el zimosán de las paredes de los hongos. Otro grupo lo forman aquellos TLRs con ligandos proteicos como TLR5 que reconoce flagelina. El tercer grupo está formado por TLR3, 7, 8 y 9, responsables del reconocimiento de ácidos nucleicos derivados de bacterias o virus [31]. Por otra parte, los TLRs pueden subdividirse en dos grupos según su localización celular. El primer grupo incluye TLR1, 2, 4, 5 y 6, que están presentes en la membrana plasmática. El segundo grupo incluye TLR3, 7, 8 y 9, localizados en compartimentos intracelulares como los endosomas. Se ha sugerido que esta localización intracelular es importante para poder discriminar el DNA viral del DNA propio [31].

El reconocimiento de los ligandos por TLRs induce su dimerización y un cambio conformacional que les permite reclutar proteínas adaptadoras hacia el dominio TIR, activándose así una cascada de señalización que conduce a la activación de NF- κ B y la inducción de genes implicados en defensa frente a microorganismos [35]. La unión de ligando induce dos rutas de señalización, una MyD88-dependiente y otra MyD88-independiente. Existen

cuatro tipos de proteínas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM) que activan selectivamente alguna de las dos rutas de señalización, llevando a la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones tipo I [31, 36] (**Figura 3**). El efecto final de la activación de los TLR es la inducción de genes que participan en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa [24, 37, 38]. En el caso de las células dendríticas, la activación de NF- κ B provoca la maduración de estas células. Además, el control de la expresión de moléculas co-estimuladoras, así como la secreción de citoquinas mediados por TLRs, promueven la activación y polarización de las células T influyendo en la respuesta adaptativa [38].

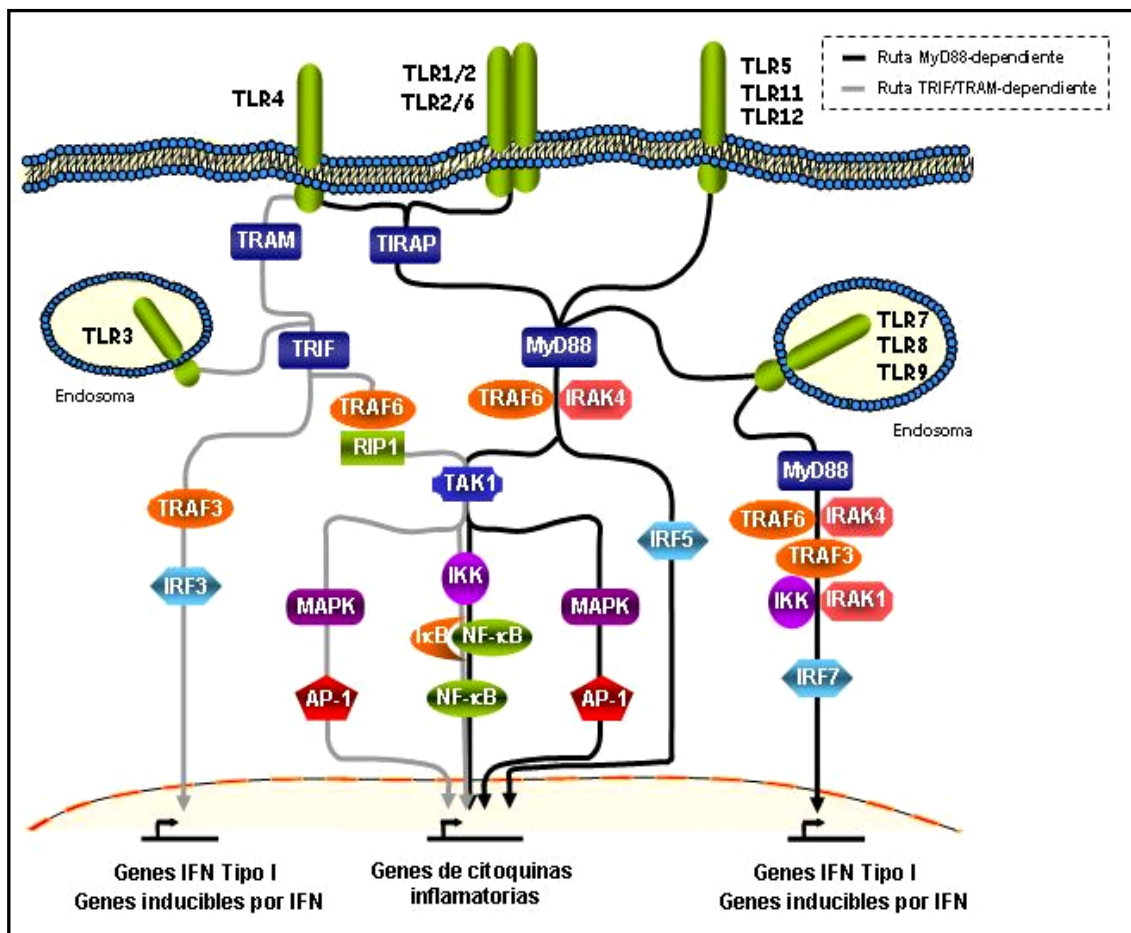


Figura 3.- Rutas de señalización a partir de TLR. Tras la estimulación, todos los TLRs excepto TLR3 reclutan MyD88, IRAKs y TRAF6 para posteriormente activar la ruta de TAK1. El complejo de TAK1 activa el complejo IKK que cataliza la fosforilación de I κ B. Las proteínas I κ B fosforiladas son degradadas por el proteasoma, liberando a NF- κ B y permitiendo así su translocación al núcleo. TAK1 también activa la ruta de las MAPK que acaban activando a AP-1. IRF5 es reclutado por el complejo MyD88/IRAK4/TRAF6, fosforilado y translocado al núcleo. Tanto NF- κ B como AP-1 e IRF5 controlan la expresión de genes que codifican para citoquinas inflamatorias. TIRAP es reclutado por TLR4, TLR1/2 y TLR2/6 tras su activación, mientras que el reclutamiento de TRIF responde a la activación de TLR3 y TLR4. TRIF puede conducir la señalización hacia la fosforilación de IRF3, su translocación al núcleo y posterior inducción de IFN tipo I y de genes inducibles por IFN, o puede interactuar con TRAF6 permitiendo así la activación de NF- κ B. En células dendríticas plasmacitoides se forma un complejo MyD88 dependiente que acaba fosforilando IRF7 que se transloca al núcleo e induce la expresión de IFN tipo I y de genes inducibles por IFN.

2.2 FAMILIA DE PROTEÍNAS NLRs: NODs y NALPs

La familia de receptores NLRs es otro de los sistemas implicados en la interacción microorganismo-huésped y cuya función es la de detectar patógenos intracelulares o señales de peligro en el interior de la célula. Esta familia recibe también los nombres de NOD-LRR y CATERPILLER, y sus miembros mejor estudiados hasta ahora son NOD1, NOD2 y NALP3. Estas proteínas intracelulares poseen tres dominios estructurales: (1) un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR) responsable del reconocimiento de PAMP; (2) un dominio intermedio NACHT ("domain present in neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), CIITA, HET-E and TP1") o motivo de unión a nucleótidos, esencial para la oligomerización y activación; y (3) un dominio efector N-terminal, que puede ser un dominio PYD ("pyrin domain"), BIR ("baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat"), o CARD ("caspase recruitment domain"), responsables de la unión a proteínas adaptadoras o efectoras [27, 39, 40]. La familia de proteínas NLR, y principalmente los receptores NOD, constituye un sistema de reconocimiento de patógenos y señalización paralelo al de los TLR. Recientemente se han descubierto solapamientos o interacciones entre las rutas de señalización de NLRs y TLRs, sugiriendo redundancia o complementación entre ambas rutas [27, 40].

NOD1 y NOD2, codificados por el gen *CARD4* y *CARD15* respectivamente, reconocen PGN y se expresan principalmente en aquellos tipos celulares que están expuestos a este componente en situaciones fisiológicas (células presentadoras de antígeno y células epiteliales). La localización intracelular implica que sus ligandos no son componentes nativos de los patógenos, sino más bien derivados de los mismos, en este caso péptidos derivados de la degradación del PGN. Normalmente las proteínas NOD están inactivas en el citoplasma y la unión del ligando provoca un cambio conformacional que permite la exposición del dominio CARD, la oligomerización de NODs, y su activación, lo que dispara las rutas de señalización que llevan finalmente a la translocación de NF- κ B al núcleo [27].

Las proteínas NOD, además de reconocer PAMPs [27], también están implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias. Concretamente, mutaciones en el gen *CARD15* están relacionadas con la enfermedad de Crohn [41] y síndrome de Blau [42], y para el gen *CARD4* existen polimorfismos asociados a enfermedades inflamatorias del intestino y asma [27, 40].

3. RECEPTORES LECTINA TIPO C (CLR)

Las lectinas (del latín “legere”= seleccionar o escoger) son proteínas que unen carbohidratos de manera específica y reversible, y que no presentan actividad enzimática. Las lectinas se encuentran presentes en toda la escala evolutiva. Aunque se cree que el primer estudio sobre lectinas lo reportó Stillmark en 1888, al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, su identificación en mamíferos no llegó hasta el descubrimiento de la denominada “lectina hepática de mamífero” por Stockert y colaboradores en 1974 [43, 44]. El término lectina como tal no aparece hasta 1954 [45].

Familia de lectina	Ligandos principales	Localización	Ejemplo de funciones
Calnexina	Glc ₁ Man ₉	RE	Procesamiento de proteínas en RE
Lectinas tipo M	Man ₈	RE	Degradación glicoproteínas
Lectinas tipo L	Varios	RE y Golgi	Procesamiento de proteínas en RE
Lectinas tipo P	Man 6-fosfato y otros	Ruta secretora	Degradación glicoproteínas
Lectinas tipo C	Varios	Extracelular/membrana celular	Inmunidad innata/adhesión celular
Galectinas	β-Galactosidos	Extracelular/citoplasma	Inmunidad/adhesión celular
Lectinas tipo I (siglecs)	Ácido siálico	Membrana celular	Adhesión celular
Lectinas tipo R	Varios	Membrana celular/Golgi	Varios
Lectinas F-box	GlnNAc ₂	Citoplasma	Degradación glicoproteínas
Ficolinas	GlnNAc, GalNAc	Extracelular/membrana celular	Inmunidad innata
Lectinas tipo quitinasa	Quito-oligosacáridos	Extracelular	Metabolismo del colágeno
Lectinas tipo F	Oligosacáridos terminados en fucosa	Extracelular	Inmunidad innata
Intelectinas	Galactosa, galactofurano	Extracelular/membrana celular	Inmunidad innata

Tabla 1.- Clasificación de las lectinas en vertebrados.

(RE, retículo endoplásmico; Gln, glucosamina; Man, manosa; GlnNAc, N-Acetil-Glucosamina; GalNAc, N-Acetil-Galactosamina) Tabla obtenida a partir de la información contenida en www.imperial.ac.uk/research/animallectins.

Desde un punto de vista estructural, las lectinas de vertebrados pueden dividirse en diferentes grupos. De los ocho grupos mejor caracterizados, cuatro contienen lectinas que son predominantemente intracelulares (familia de la calnexina, tipo M, tipo L y tipo P) y otros cuatro

se corresponden con lectinas extracelulares que bien son secretadas o permanecen en la membrana plasmática de la célula (Lectina tipo C, tipo R, siglecs y galectinas). Recientemente se ha postulado la posible existencia de nuevos grupos de lectinas animales (Lectina F-box, ficolinas, lectinas tipo quitinasa, lectina tipo F e intelectinas). Estas familias de lectinas, además de ser diferentes estructuralmente, también poseen peculiaridades en cuanto a los carbohidratos que unen, su localización y su función (**Tabla 1**).

Uno de los grupos de lectinas mejor estudiados es el de las lectinas tipo C, que se caracteriza por poseer dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) dependientes de Ca^{2+} . Los CRD dependientes de Ca^{2+} se describieron por primera vez en el receptor de la asialoglicoproteína de mamíferos y en la lectina de unión a manosa [46, 47]. Los iones de Ca^{2+} están implicados directamente tanto en la unión con el ligando, como en el mantenimiento de la integridad estructural del CRD necesario para su actividad [48]. Clásicamente se han definido siete sub-grupos de lectinas tipo C (**Tabla 2**). Esta clasificación se basa en la homología de secuencia, en su estructura global y en la posición del dominio CRD respecto al resto de la molécula [49]. Tres de los sub-grupos están formados por lectinas solubles (grupo I, III y VII) que incluyen a la lectina de unión a manosa (MBL) [46] y las proteínas del surfactante pulmonar A (SP-A) y D (SP-D) [50], ambas colectinas pertenecientes al grupo III. Los otros cuatro sub-grupos se corresponden con lectinas tipo C de membrana, e incluyen proteínas tipo I y II según la localización del extremo N-terminal. Las proteínas de tipo I, como el receptor de manosa (MR), poseen su extremo N-terminal en el exterior de la célula [51], mientras que, las tipo II, como CD23, tienen su región N-terminal en el interior [52].

Grupo	Moléculas representativas	Características
I	Agrecano, versicano, neurocano	Proteoglicanos, glicoproteínas de matriz extracelular
II	Receptor de asialoglicoproteína, CD23, DC-SIGN, LSECtin	Receptores de membrana tipo II
III	Proteína de unión a manosa, SP-A, SP-D	Colectinas. Oligómeros asociados por un dominio tipo colágeno. Extracelulares y solubles
IV	Selectinas L, P y E	Glicoproteínas de membrana de tipo I, implicadas en adhesión leucocitaria
V	NKG2, LY49, CD69	Antígenos linfocitarios de tipo II
VI	Receptor de manosa, DEC-205	Receptores de membrana de tipo I con varios CRD extracelulares
VII	Proteína asociada a pancreatitis/hepatoma	Extracelulares y solubles.

Tabla 2.- Clasificación de las lectinas tipo C.

3.1 DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN LAS LECTINAS TIPO C

El grupo de las lectinas tipo C incluye proteínas solubles y ancladas a membrana que comparten la presencia de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Sin embargo, no todos los dominios CRD de las lectinas tipo C pueden unir carbohidratos y Ca^{2+} , y por ello actualmente se denomina a este dominio como CTLD ("C-type lectin-like domain"). En este nuevo término quedan incluidos todos aquellos miembros relacionados estructuralmente aunque carezcan del sitio principal de unión a Ca^{2+} o incluso presenten motivos de reconocimiento de azúcares alternativos [53, 54].

El dominio CRD se caracteriza por la presencia de 14 aminoácidos invariantes y otros 18 altamente conservados que determinan su plegamiento. Los estudios de cristalografía han confirmado que el CRD es un dominio globular compacto con estructura de doble lazo, y cuatro residuos de cisteína (C1-C4) que forman dos puentes disulfuros en la base de los lazos y suponen los residuos más conservados del dominio. Además, otra de las secuencias características y muy conservadas es el motivo "WIGL", que se emplea como punto de referencia para análisis de secuencias [53]. Este dominio CRD contiene de 3 a 4 sitios potenciales de unión a calcio, dependiendo de la lectina y las condiciones de cristalografía, aunque normalmente se considera que el sitio de unión a calcio #2 es el responsable de la unión al ligando. El resto de los sitios de unión a calcio presentan una función estructural, de tal forma que se establecen enlaces de coordinación con la superficie de la proteína y con grupos hidroxilos claves de la molécula de azúcar, ayudando todo ello a la estabilidad de la proteína [53, 54]. Sin embargo, algunas de lectinas tipo C carecen del sitio de unión a calcio #2, como ocurre en la mayoría de las lectinas pertenecientes al grupo V. La secuencia aminoacídica del CRD determina en parte la especificidad de la molécula, de tal modo que aquellos receptores que contienen la secuencia aminoacídica EPN tienen especificidad por ligandos tipo manosa, mientras que la secuencia QPD confiere especificidad por glucosa/galactosa [55].

La variabilidad estructural de las lectinas tipo C es amplia, ya que algunas contienen únicamente una región CTLD, mientras otras tienen múltiples dominios CTLD [51, 56]. Las lectinas asociadas a la membrana celular disponen de un cuello con tamaño variable, que separa el dominio CTLD de la región transmembranal y que en la mayoría de los casos es capaz de mediar la multimerización de la molécula.

3.2 LECTINAS TIPO C EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas, en su estadio inmaduro, requieren de receptores endocíticos para una captura antigénica eficiente, y la mayoría de ellos pertenecen a la familia de las lectinas tipo C [14]. La mayoría de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas pertenecen a los grupos II, V y VI, que incluyen lectinas tanto dependientes como independientes de calcio, y con uno o varios CTLDs (“C-type lectin-like domain”). Como consecuencia de su implicación en la detección de “señales de peligro”, algunos autores consideran a las lectinas tipo C como verdaderos PRRs, y las agrupan funcionalmente con los TLR y moléculas NOD [14, 57, 58]. Las lectinas tipo C de las células dendríticas contribuyen al programa de maduración específico para cada patógeno, no sólo por su participación activa en la captación de antígeno, sino porque modulan las rutas de señalización intracelular activadas tras la interacción con otros PRRs [59-64]. Estas lectinas también pueden mediar la extravasación de las células dendríticas de los vasos linfáticos y facilitar interacciones con linfocitos T, aunque esto es aún objeto de debate [65, 66].

La mayoría de estas lectinas no son exclusivas de células dendríticas, sino que se expresan en otros tipos celulares del sistema inmune. Aunque durante los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de todas ellas, aún hay cuestiones clave que faltan por resolver, especialmente su especificidad de reconocimiento de ligandos o la regulación de su expresión. Las características principales de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas humanas, como la especificidad de ligando, distribución celular y función, pueden verse resumidas en la **Tabla 3**.

Como se ha descrito anteriormente, aunque las lectinas tipo C expresadas en las células dendríticas funcionan principalmente como receptores de patógenos y en la captura de antígeno [14], también influyen en la respuesta inmune en virtud de su capacidad de señalización intracelular, la cual afecta a la producción de citoquinas responsables de la polarización de las células T. Esta función dual convierte a las lectinas tipo C en candidatas para el desarrollo de estrategias de inducción de tolerancia y/o vacunación. En este aspecto, dirigir antígenos hacia las células dendríticas vía este tipo de lectinas se considera ya una herramienta potencialmente efectiva para provocar respuestas específicas de antígeno por parte de las células T [67-69], así como para vacunación [67, 68]. Además, reactivos con capacidad de bloquear estas lectinas tipo C (anticuerpos, ligandos solubles específicos) podrían incluso ser considerados como una alternativa para limitar el acceso de patógenos a células dendríticas.

Lectina	Tipo/Grupo	"GENE SYMBOL"	Distribución	Especificidad	Función	Motivos citoplásmicos
MR	I / VI	MRC1	MDM, MO MDDC LC	Manosa Fucosa GlnNAc LeX	Captura antigénica Adhesión cel-cel R. patógenos R. ligandos propios	FENTLY
DEC-205	I / VI	LY75	LC, DCs, B-cel, MO, tEC	ND	Captura antigénica	FSSVRY EDE
LOX1	II / V	ORL1	vEC, mDC, Mo, MO, MDDC, B-cel	ND	R. patógenos Captura antigénica	DD DE YSPWW
DECTIN-1	II / V	CLEC7A	mDC and pDC LC PMN, Mo, MO MDDC T-cel , B-cel	ND	Captura antigénica R. patógenos Activ. coestimuladora Adhesión cel-cel	DED YTQL
CLEC-1	II / V	CLEC1A	mMDDC	ND	ND	YSST DDD
CLEC-2	II / V	CLEC1B	mMDDC Mo, NK, plaqueta	ND	R. patógenos	DxYITL
DCAL-2	II / V	CLEC12A	PMN, Mo, MDM, MDDC mDC, pDC	ND	Captura antigénica	VxYxxL
DCAL-1	II / V	ND	mDC and pDC MDDC B-cel	ND	Activ. coestimuladora	EEE
DECTIN-2	II / II	CLEC6A	DCs, pDC, LC Mo, B-cel, T- cel	Manosa	ND	No Y
DCIR	II / II	CLEC4A	DCs, Mo, MO	ND	ND	ITYAEV
BDCA-2	II / II	CLEC4C	pDC, iMDDC	ND	Captura antigénica	EEE
MGL/HML	II / II	CLEC10A	iMDDC MDM, aaMDM MO de piel	GalNAc	R. ligandos propios R. patógenos Captura antigénica Adhesión cel-cel	YxxF LL
Langerina	II / II	CD207	LC	Manosa Fucosa GlnNAc	Formación gránulos de Birbeck Captura antigénica R. patógenos	Motivo rico en prolinas
DC-SIGN	II / II	CD209	DCs, MO MDDC, aaMDM	Manano GlnNAc Le ^x Fucosa	Captura antigénica Adhesión cel-cel R. patógenos R. ligandos propios	YKSL LL EEE
CD23	II / II	FCER2	Mo, B-cel, eosinófilos, DCs	GalNAc	Adhesión cel-cel Captura antigénica	YSEI
LSECtin	II / II	CLEC4G	LSEC, LNSEC, mDC, tMO MDDC, aaMDM	GlnNAc	Captura antigénica R. patógenos	YSKV EE

Tabla 3.- Lectinas tipo C expresadas en células dendríticas. Características principales sobre especificidad de ligando, distribución celular y secuencias potencialmente implicadas en internalización/señalización. (ND=no determinada; aaMDM, macrófagos activados alternativamente; DC, célula dendrítica; i/mMDDC, célula dendrítica derivada de monocito inmadura/madura; LC, célula de Langerhans ; LNSEC, células endoteliales sinusoidales de nódulo linfático; LSEC, células endoteliales sinusoidales de hígado; mDC, célula dendrítica mieloide; MDDC, célula dendrítica derivada de monocito; MDM, macrófago derivado de monocito; Mo, monocito; MØ, macrófago; NK, células "natural killer"; pDC, célula dendrítica plasmacitoide; PMN, célula polimorfonuclear; tEC, célula endotelial tímica; vEC, célula endotelial vascular; GalNAc, N-Acetil-Galactosamina; GlnNAc, N-Acetil-Glucosamina; Le^x, Lewis^x; Act., actividad; R., reconocimiento; Cel, célula).

3.3 ACTIVIDADES FUNCIONALES DE LAS LECTINAS TIPO C EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Captura de antígeno e internalización

Desde un punto de vista funcional, la mayoría de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas median la captación e internalización de antígenos para su posterior degradación y presentación en el contexto de moléculas MHC. Hasta ahora se han identificado tres motivos localizados en los dominios citoplásmicos responsables de esta actividad (secuencias que contienen tirosina, di-leucina y ácido di/tri-acídico) (**Figura 4**). Dichos motivos median la translocación de las lectinas a los endosomas primarios o secundarios, y lisosomas [70]. Las estructuras del citoesqueleto que participan en la internalización de las lectinas tipo C permanecen en gran parte sin caracterizar, aunque un trabajo reciente ha descrito la interacción entre la cola citoplásmica de DC-SIGN y la Proteína-1 específica de linfocitos (LSP-1) [71], una molécula de unión a actina que afecta a la reorganización del citoesqueleto y a la forma celular [72, 73]. La capacidad de internalización que tienen las lectinas tipo C mieloides, inicialmente descrita para la familia del receptor de manosa y DEC-205, constituye la base para el posible desarrollo de estrategias de vacunación [74-76]. La lista de lectinas expresadas en células dendríticas cuya internalización resulta en la generación de inmunidad mediada por células T incluye al receptor de manosa [77, 78], DEC-205 [67, 74, 75], DC-SIGN [68, 79], LOX-1 [80], BDCA2 [81], Dectin-1 [69] y langerina [82].

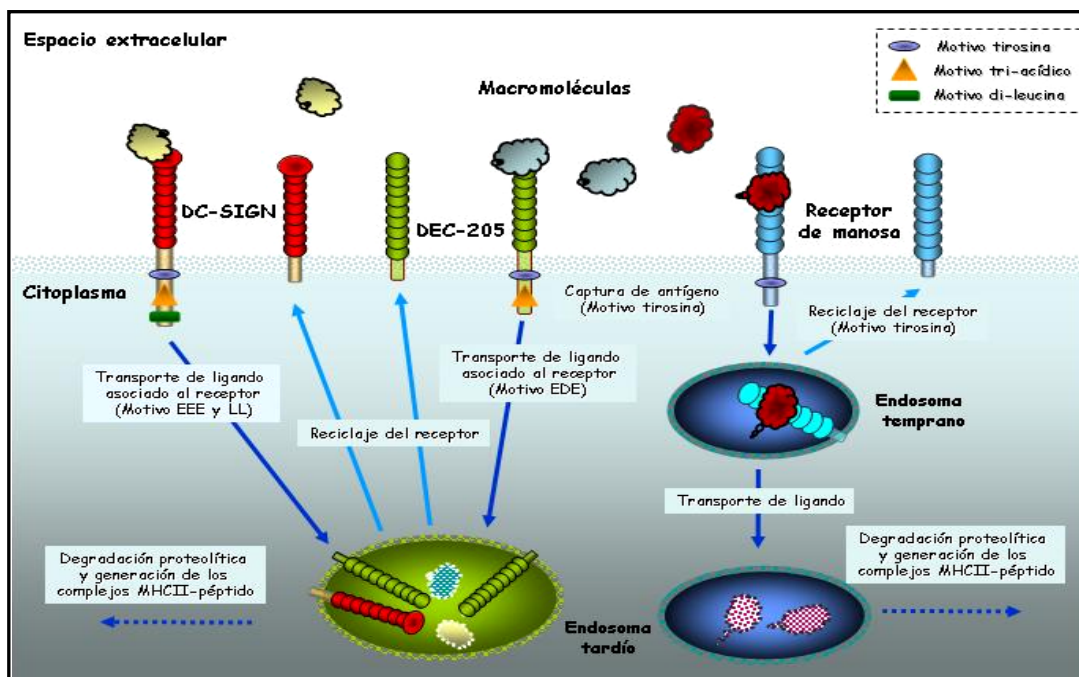


Figura 4: Captura de antígenos e internalización. Esquema representativo de los motivos citoplásmicos de DC-SIGN, MR y DEC-205 implicados en captura de antígeno e internalización.

Función “scavenger” y homeostasis tisular

Son muchas y variadas las estructuras azucaradas reconocidas por las lectinas tipo C que portan las células dendríticas (**Tabla 3**), lo cual evidencia la promiscuidad de estas lectinas y su reducida especificidad de ligando. Por este motivo, algunas de estas lectinas pueden ser consideradas como receptores “scavenger”, donde las fuerzas electroestáticas parecen ser las responsables del reconocimiento de ligando. Dentro de este grupo merece ser mencionada la lectina LOX-1, expresada en numerosos tipos celulares incluyendo células endoteliales, y cuyo rango de ligandos (LDL oxidados, fosfolípidos aniónicos, componentes bacterianos) [83] ha sugerido su participación en los estadios iniciales de procesos de aterosclerosis [84]. La función “scavenger” de algunas de estas lectinas puede también contribuir al mantenimiento de la homeostasis tisular, ya que efectuarían la retirada de proteínas extracelulares y hormonas del medio circundante. De hecho, el receptor de manosa es capaz de unir enzimas como la hidrolasa lisosomal y mieloperoxidasa liberada por neutrófilos [54], y los ratones deficientes en el receptor de manosa exhiben mayores niveles de lutropina en suero [85].

Reconocimiento de patógenos

Posiblemente también como consecuencia de la capacidad de internalización de estas moléculas, numerosos patógenos eligen y “utilizan” a las lectinas endocíticas como medio para acceder al interior celular. Datos de los últimos cinco años ilustran claramente el papel de las lectinas tipo C en la unión y captación de patógenos como parásitos, bacterias y virus [86-89]. Sin embargo, todavía se desconoce si la unión de patógenos a lectinas constituye un auténtico “reconocimiento” del patógeno o si las lectinas son un “factor atrayente” para los patógenos empleado en su estrategia para evadir la respuesta inmune. Aunque la primera explicación está apoyada por la alta susceptibilidad a *Streptococcus pneumoniae* exhibida por los ratones deficientes para SIGNR-1 [90, 91], éste puede no ser el caso para todas las lectinas tipo C. En este aspecto, el papel de cada una de las lectinas en la respuesta inmune frente a un determinado patógeno se acepta que va a depender de su especificidad y de la señalización intracelular iniciada tras la unión de sus ligandos [86].

La diversidad de las colas citoplásmicas de las lectinas tipo C presentes en células dendríticas explica su capacidad diferencial de disparar señales intracelulares. Dichas regiones contienen motivos ITAM-*like*, ITIM-*like* o hemi-ITAM (**Tabla 3**) [92], e incluso podrían mediar la asociación a proteínas adaptadoras con motivos ITAM a través de residuos cargados en su región transmembrana [93]. En términos más amplios, la unión del ligando a la lectina puede resultar en la maduración de las células dendríticas y liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12), producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) o modulación de las señales

originadas por receptores de patógenos como los TLRs. Un ejemplo representativo de la primera alternativa es Dectin-1, que induce la producción y liberación de IL-12 y TNF- α en respuesta a zimosan y a hongos vivos en colaboración con TLR-2 [94, 95]. En cambio, Dectin-1 promueve la producción de IL-10 de manera independiente a los TLRs y, de igual manera, la ligación de DCAL-2 induce IL-6 e IL-10, pero potencia la producción de IL-12 y polarización hacia Th1 tras recibir el estímulo por el ligando de CD40 [96]. Por el contrario, DCAL-2 puede suprimir la producción de IL-12 inducida por TLR [96], y la ligación de BDCA-2 disminuye la liberación de interferón α/β por parte de las células dendríticas plasmacitoides [81], indicando todo ello que ambas lectinas pueden también funcionar de una forma “inhibitoria”. En el caso de DC-SIGN, el reconocimiento de su ligando da lugar a una inhibición en la liberación de IL-12 inducida por TLR y un incremento en la producción de IL-10 [97-99], lo que sugiere un papel “inhibitorio”. A pesar de ello, se sabe que las interacciones de DC-SIGN con ligandos derivados de *Neisseria meningitidis* no afectan a la producción de IL-10, lo que reafirma su capacidad de modular la respuesta inmune de manera patógeno-dependiente, al igual que en el caso de Dectin-1 [100].

Activación del complemento

La activación de complemento es la función por excelencia de la lectina soluble de unión a manosa (MBL) [101, 102]. Recientemente, la unión y activación del complemento ha sido añadida a la lista de actividades desarrolladas por otras lectinas de membrana. La cromatografía de afinidad con SIGNR1 recombinante, miembro de las lectinas murinas homólogas a DC-SIGN [103, 104], resultó en el aislamiento de C1q, una interacción que ha sido posteriormente demostrada a nivel celular [105]. Ello ha llevado a sugerir la importancia de esta interacción en la erradicación de la infección por *Streptococcus pneumoniae* [105], y quizás las regiones del cuello ricas en leucinas de otras lectinas tipo C de células dendríticas puedan exhibir esta misma capacidad de unión y activación del complemento.

Adhesión y migración celular

Considerando el papel fundamental de la familia de las selectinas en la migración transendotelial leucocitaria [49], no sorprende que se haya relacionado a las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas con migración y adhesión celular. Así, se ha publicado que DC-SIGN interacciona con ICAM-3 [106], CD11b/CD18 [107], CEA [108] y CEACAM-1 [109], mediando adhesión de células dendríticas a linfocitos T, neutrófilos y células tumorales, respectivamente. También se ha descrito a DC-SIGN como una molécula potencialmente implicada en *rolling*, por su capacidad de interactuar con ICAM-2 [65]. La interacción de DC-SIGN con la integrina CD11b/CD18 recuerda la función de CD23, que interacciona con

integrinas leucocitarias como CD11b/CD18 y CD11c/CD18 [110]. Otras lectinas propuestas como mediadoras de adhesión célula-célula son Dectin-1 [111], DCAL-1 [112], MGL [66] y el receptor de manosa [113]. En el caso de Dectin-1 y DCAL-1, sus habilidades adhesivas se han deducido de sus capacidades para actuar como moléculas coestimuladoras sobre los linfocitos T, algo también descrito para MGL [66]. Es preciso mencionar que estos resultados podrían reflejar la capacidad de estas lectinas de interactuar con moléculas recombinantes con glicosilación aberrante o moléculas de membrana con glicosilación alterada. Por ello, aún son necesarios estudios adicionales para poder establecer definitivamente a las lectinas tipo C de las células dendríticas como verdaderos receptores de adhesión.

3.4 GRUPOS DE LECTINAS TIPO C EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

La mayoría de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas están también presentes en otros tipos celulares derivados de médula ósea (macrófagos, neutrófilos, células NK, linfocitos B) y en linajes no hematopoyéticos (**Tabla 3**). Sin embargo, existen algunas excepciones y, de hecho, algunas lectinas tipo C son actualmente empleadas como marcadores específicos de distintos sublinajes y sub-tipos de células dendríticas. Concretamente, Langerina (CD207), BDCA-2 y DC-SIGN son los marcadores de elección para la identificación de células de Langerhans, células plasmacitoides y dérmicas, respectivamente, y podría ocurrir que otras lectinas constituyeran marcadores para la definición de otros linajes celulares con capacidad de presentación de antígeno. La distribución celular, así como las propiedades estructurales y funcionales de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas se muestran en la **Tabla 3**. A continuación se describen las características más relevantes de las diferentes familias de lectinas tipo C expresadas en células dendríticas, y clasificadas según su localización génica.

3.4.1 Lectinas codificadas en el cromosoma 2: LANGERINA y DEC-205

Langerina, también llamada CD207 y CLEC4K, fue descrita como una glicoproteína exclusivamente expresada en células de Langerhans [114]. El gen que codifica langerina se encuentra adyacente al gen *CLEC4F*, que codifica una molécula homóloga a la lectina tipo C específica de células de Kupffer en rata y cuya expresión en células dendríticas aún no ha sido estudiada. Una propiedad estructural distintiva de langerina es la presencia de un motivo rico en prolina localizado en el dominio intracelular y para el que se ha propuesto un papel en transducción de señales [115]. La langerina, una vez unida a su ligando, es rápidamente internalizada. Sin embargo, y a diferencia de otros receptores endocíticos de la familia de las lectinas tipo C, no se dirige a compartimentos de MHC de clase II, sino que es enviada a rutas de procesamiento de antígeno no clásica. De hecho, la langerina es necesaria para la correcta

presentación de antígenos de *Mycobacterium leprae* vía CD1a por parte de las células de Langerhans [82]. Otro aspecto interesante de la langerina es su capacidad de promover la formación de orgánulos subcelulares característicos de las células de Langerhans, denominados gránulos de Birbeck, incluso cuando es expresada en células de linaje no hematopoyético [115]. De hecho, un polimorfismo en la región implicada en reconocimiento de azúcares afecta a la formación de los gránulos de Birbeck [116]. Desde el punto de vista de la capacidad de unión de patógenos, la langerina ha sido implicada en la unión de la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) [117] y podría contribuir al reconocimiento de micobacterias [118]. Respecto a HIV-1, y contrariamente a DC-SIGN, la captura del HIV-1 por la langerina resulta en una internalización del virus hacia los gránulos de Birbeck y su posterior degradación, lo cual ha llevado a proponer a langerina como una barrera natural frente a la infección por HIV-1 [119].

Otras de las lectinas codificadas en el cromosoma 2 (2q24) en humanos es DEC-205, también llamada CD205 o CLEC13B. Esta lectina pertenece a la familia del Receptor de Manosa, formada por cuatro miembros: receptor de manosa, DEC-205, receptor de fosfolipasa A2 y Endo-180. Todos ellos son receptores transmembrana tipo I con estructura similar, un dominio N-terminal rico en cisteínas, un dominio fibronectina tipo II y un número variable de dominios CTLD (entre 8 y 10) [51]. DEC-205 contiene 10 dominios CTLD, aunque ninguno de ellos presenta las secuencias consenso requeridas para unión a calcio o carbohidratos. A pesar de la expresión preferencial de DEC-205 en células dendríticas de ratón, en humanos se han detectado mayores niveles de esta lectina en células dendríticas mieloides de sangre y monocitos, niveles moderados en células B, y menores en células NK, células dendríticas plasmacitoides de sangre y células T [120]. A diferencia de los otros miembros de la familia del Receptor de Manosa, los niveles de CD205 aumentan durante la maduración de células dendríticas inducida por LPS u otras citoquinas inflamatorias (TNF- α y IL-1 β), como resultado de una síntesis "de novo" y de una redistribución de las moléculas desde los compartimentos endocíticos a la superficie celular [121]. DEC-205 es también un receptor endocítico que promueve la posterior presentación de antígenos a linfocitos T. Sin embargo, y a diferencia de otras lectinas de su misma familia, DEC-205 dirige sus ligandos a los endosomas tardíos, desde donde se recicla a la membrana (**Figura 4**) [122]. Esta característica le viene conferida por la presencia de dos motivos localizados en la región citoplásmica: una próxima a la región transmembrana (secuencia aminoacídica FSSVRY) implicada en internalización y otra más distal (EDE) asociada al transporte hacia los endosomas tardíos y por tanto a una posterior presentación antigénica. El hecho de que DEC-205 se dirija a endosomas tardíos se asocia con una mayor eficiencia en el procesamiento y presentación vía moléculas de MHC clase II [122, 123]. Por otra parte, la capacidad endocítica de DEC-205 se ve suprimida en células dendríticas maduras, donde además se detectan niveles de la proteína de fusión recientemente identificada

CD205-DCL-1, que algunos sugieren como la responsable de esta pérdida de función de DEC-205 [121, 124]. Por tanto se puede concluir que CD205 tiene dos funciones diferentes, una como receptor endocítico en células dendríticas inmaduras y otra como molécula no endocítica en las células dendríticas maduras [121]. Respecto a la presentación de antígeno, DEC-205 en células dendríticas en reposo es capaz de presentar antígeno vía MHC clase I e inducir tolerancia en células TCD8+ [75]. Sin embargo, la captación de antígenos mediada por DEC-205 en presencia de activadores de las células dendríticas promueve una respuesta de células T más efectiva, observándose una mayor resistencia a tumores o infecciones víricas a nivel sistémico [67]. Aunque su especificidad de ligando aún no ha sido determinada, las propiedades funcionales de DEC-205 en presentación de antígenos la convierten en una diana potencial para el diseño de vacunas y desarrollo de protocolos de inmunoterapia.

3.4.2 Lectinas codificadas en el cromosoma 10: RECEPTOR DE MANOSA

El receptor de manosa (MR) es una de las lectinas tipo C más expresadas en células dendríticas y ha sido objeto de estudio durante muchos años. MR o CD206 contiene 8 dominios CTLD, aunque sólo dos de ellos (4 y 5) tienen la capacidad de unir azúcares. La región rica en cisteínas del MR posee la capacidad de unir azúcares con sulfatos, característica no detectada en las otras lectinas de la familia [51, 125]. MR se identificó inicialmente en macrófagos alveolares de conejo como una proteína transmembranal de más de 150kDa que reconoce cadenas de polisacáridos terminados en manosa, fucosa o N-Acetil-Glucosamina [51]. MR reconoce estas estructuras azucaradas en un amplio rango de microorganismos (hongos, bacterias, parásitos y virus), pero también en ligandos endógenos como las hidrolasas lisosomales [54] y la L-selectina, mediando la interacción con linfocitos en el proceso de salida desde el nódulo linfático [126]. El receptor de manosa, una vez que une a su ligando en membrana, es capaz de internalizarlo y dirigirlo a los endosomas tempranos donde el antígeno va a ser procesado y cargado en moléculas MHC de clase II para su posterior presentación a células T. Una vez que el receptor ha “descargado” en los endosomas tempranos, se mantiene intacto y es redirigido a la membrana celular (**Figura 4**). Una de las regiones necesarias para que el proceso de internalización tenga lugar adecuadamente es la secuencia de aminoácidos FENTLY de su dominio citoplásmico [51].

Se ha descrito también una forma soluble del MR, que se origina por la proteólisis de la forma de membrana y mantiene la capacidad de unir azúcares. La proporción de la forma soluble alcanza hasta un 20% del total de MR, por lo que se piensa que podría estar implicada en el transporte de proteínas manosiladas desde el foco de inflamación a otras partes del cuerpo [123]. De todas formas, el hecho de que los ratones deficientes en MR presenten una respuesta inmune normal frente a una infección sistémica por diferentes hongos [127, 128] y

muestran una mayor presencia de proteínas inflamatorias en suero [129] hace pensar que quizás su principal papel fisiológico sea el mantenimiento de la homeostasis tras un proceso inflamatorio.

3.4.3 Lectinas codificadas en el cromosoma 12: LECTINAS DEPENDIENTES (DCIR) E INDEPENDIENTES (DECTIN-1) DE CALCIO

Dentro del cromosoma 12 se encuentran codificados dos grupos de genes que codifican lectinas tipo C, algunas de las cuales se expresan y desarrollan funciones importantes en el reconocimiento de patógenos por células dendríticas (**Figuras 5 y 6**). El primer grupo incluye los genes que codifican para BDCA-2, DCIR, DECTIN-2, MCL y MINCLE, cuyas características principales se muestran en la **Tabla 3**. Aunque estas lectinas pueden ser detectadas en poblaciones de células dendríticas, la mayoría se expresan también en neutrófilos, macrófagos e incluso células B y T [130, 131].

	BDCA2	DCIR	DECTIN2	MCL	MINCLE
Reconocimiento de patógenos	?	?	+	?	?
Captura antigénica	+	+	?	+	?
Interacción célula-célula	?	?	?	?	?

Figura 5.- Lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 12. Grupo de genes de lectinas tipo C dentro del cromosoma 12 con indicación de las actividades funcionales bien definidas o desconocidas actualmente. Las moléculas expresadas en células dendríticas se encuentran enmarcadas con una línea de puntos discontinuos.

Dectin-2 o CLEC6A se expresa fundamentalmente en células dendríticas plasmacitoides y células de Langerhans [132, 133], y presenta afinidad por estructuras ricas en manosa, como las presentes en *Candida albicans* o partículas de zimosán, pero una débilmente polisacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae* [134]. DCIR (CLEC4A) contiene en su región citoplásmica un motivo ITIM, lo que sugiere que podría funcionar como un receptor inhibitorio [135]. BDCA-2 (CD303 o DLEC) es especialmente relevante por su expresión preferencial en células dendríticas plasmacitoides [81, 136, 137]. BDCA-2 es capaz de internalizarse tras la unión de anticuerpos específicos y presentar eficientemente péptidos

derivados en el contexto de MHC II, aunque no se conoce su especificidad de reconocimiento de carbohidratos ni las proteínas adaptadoras implicadas en su señalización [81, 138]. Una vez unido su ligando, BDCA-2 induce movilización de calcio y fosforilación de tirosinas intracelulares, lo que resulta en la inhibición de la producción de interferón α/β . Este hecho podría ser utilizado por algunos virus como estrategia para escapar de la respuesta inmunitaria [81].

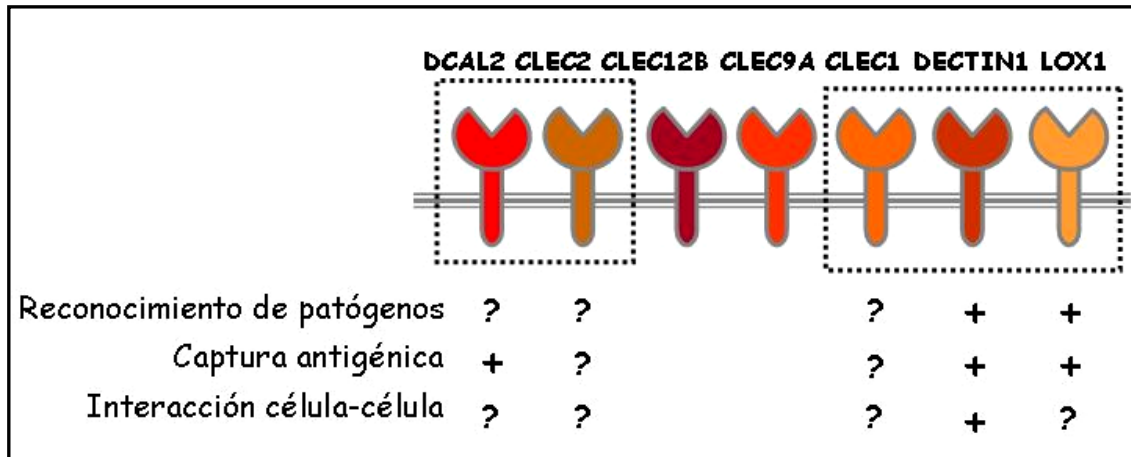


Figura 6.- Lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 12. Grupo de genes de lectinas tipo C dentro del cromosoma 12 con indicación de las actividades funcionales bien definidas o desconocidas actualmente. Las moléculas expresadas en células dendríticas se encuentran enmarcadas con una línea de puntos discontinuos.

El segundo *cluster* génico presente en el cromosoma 12 incluye, entre otros, los genes que codifican para DCAL-2, CLEC-1 y 2, LOX-1 y Dectin-1 (**Figura 6**), todos los cuales parecen reconocer carbohidratos de manera independiente de iones metálicos. Dectin-1 ha atraído mucha atención en los últimos años por ser el mayor receptor de β -glucanos en macrófagos y células dendríticas, y por su colaboración con TLRs en el establecimiento de la respuesta frente a patógenos fúngicos [94, 95, 139, 140] como *Candida albicans* [141], *Aspergillus fumigatus* [142], *Pneumocystis carinii* [143] y *Coccidioides posadasii* [144]. El papel principal de Dectin-1 en inmunidad anti-fúngica se ha puesto de manifiesto mediante el empleo de ratones deficientes para esta lectina, que muestran una mayor susceptibilidad a la infección por *Candida Albicans* [145] o *Pneumocystis carinii* [146]. Curiosamente, Dectin-1 no reconoce las hifas, a pesar de que éstas pueden exponer β -glucanos [147]. Dado que Dectin-1 contiene un motivo ITAM [92], y su interacción con ligando provoca una liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, la capacidad de reconocimiento estado-específica de Dectin-1 podría permitir al sistema inmunitario innato responder exclusivamente ante formas fúngicas invasivas o dañinas, evitando daños tisulares innecesarios. También se ha propuesto que Dectin-1 reconoce ligandos proteicos y funciona como molécula coestimuladora [111], aunque el ligando específico aún no se ha identificado. La interacción de β -glucanos con Dectin-1 provoca la producción de TNF- α y IL-12 (ambos de manera dependiente de TLR2/6, MyD88 y NF- κ B), así como la liberación de IL-10 de manera TLR-independiente y Syk- y CARD9-dependiente [62, 92]. Recientemente se ha

descrito que la tetrasparina CD37 se asocia y estabiliza a Dectin-1 en la membrana, y modula la producción de IL-6 dependiente de Dectin-1 [148].

3.4.4 Lectinas codificadas en el cromosoma 17: MGL

Este *cluster* incluye los genes que codifican la lectina de galactosa de macrófagos o MGL y los receptores de asialoglicoproteínas específicas de hígado 1 y 2. MGL (CLEC10A, CD301, HML) reconoce estructuras de carbohidratos que poseen residuos terminales de Gal/GalNAc, particularmente los epítomos Tn (GalNAc unido a serina o treonina) asociados a carcinoma humano [149]. MGL, de la cual se han identificado hasta siete isoformas generadas por procesamiento alternativo, se expresa en células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea *in vitro* [150, 151] y es considerada como un marcador de macrófagos activados por la vía alternativa [152], por su inducibilidad por IL-4 [152]. Como ocurre con miembros de la familia de DC-SIGN, MGL funciona como "factor de anclaje" para favorecer la entrada del virus Ébola, especialmente de las especies más patógenas [153], y una glicoproteína de huevos de *Schistosoma mansoni* [154]. MGL interacciona con CD45, por lo que podría influir en la función y proliferación de células T [66]. MGL también reconoce gangliósidos propios y antígenos tumorales como la mucina tipo 1 (MUC1) aberrantemente glicosilada, lo que sugiere que podría jugar un papel en la progresión tumoral [154, 155].

3.4.5 Lectinas codificadas en el cromosoma 19

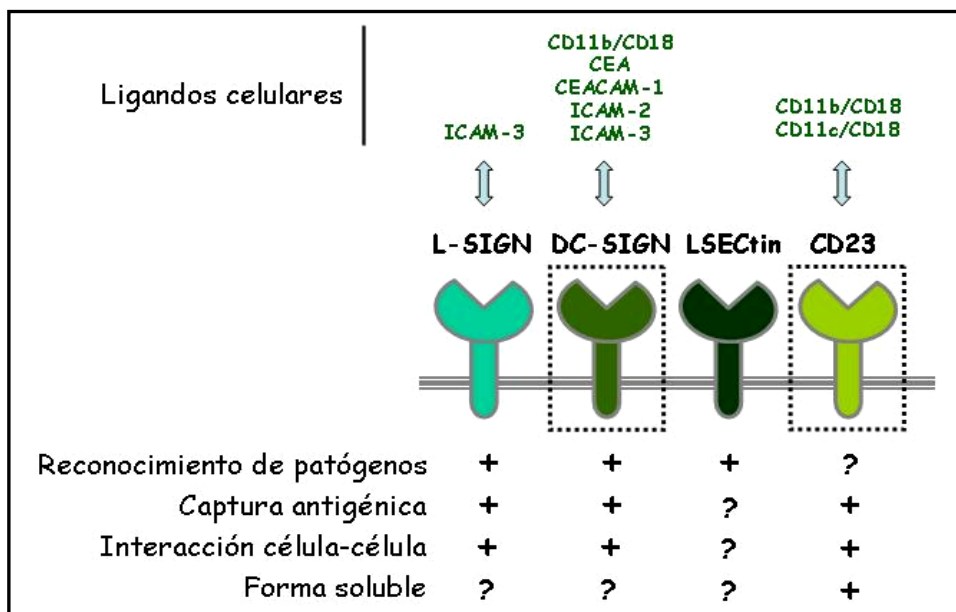
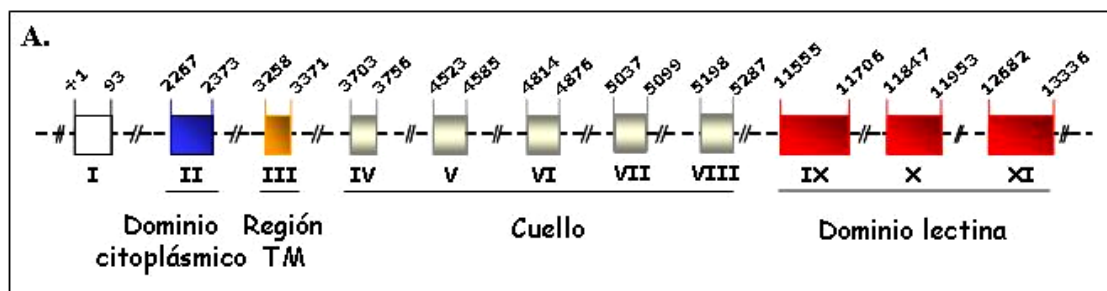


Figura 7.- Lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 19. Grupo de genes de lectinas tipo C dentro del cromosoma 19 con indicación de las actividades funcionales bien definidas o desconocidas actualmente, y sus ligandos celulares. Las moléculas expresadas en células dendríticas se encuentran enmarcadas con una línea de puntos discontinuos.

Este *cluster* de genes codifica para las lectinas DC-SIGNR, DC-SIGN, LSELECTin y CD23, e incluye un pseudogen con alta homología con el gen de LSELECTin (**Figura 7**) [156]. Estas cuatro lectinas están implicadas en captura de antígenos y las tres primeras son consideradas como “factores de unión” de patógenos. Sin embargo, las células dendríticas no presentan DC-SIGNR, cuya expresión está restringida fundamentalmente a células endoteliales sinusoidales hepáticas y de nódulo linfático [157, 158]. Algunas de las características principales de las distintas lectinas codificadas en este *cluster* se indican en la **Figura 7**.



CD23, también conocido como receptor de baja afinidad para la inmunoglobulina E (IgE) (FcεRII), fue descrita por primera vez por Lawrence y colaboradores en 1975. CD23 es por tanto la primera lectina conocida de este *cluster* de genes, pero sin embargo, no es de las que más se conoce, e incluso en la última década viene siendo la “olvidada” lectina tipo C de células dendríticas. El hecho de que CD23 no sea un miembro más de la superfamilia de las inmunoglobulinas, sino que presente homología con las

lectinas tipo C, convierte a este receptor en único dentro de los receptores Fc. CD23 es una proteína de membrana tipo II de 45kDa expresada en varios tipos celulares, como linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas foliculares, plaquetas y eosinófilos. Se han identificado dos isoformas de CD23 (CD23a y CD23b) que difieren en seis aminoácidos en su extremo N-terminal, y que se generan por la utilización de diferentes sitios de iniciación de la

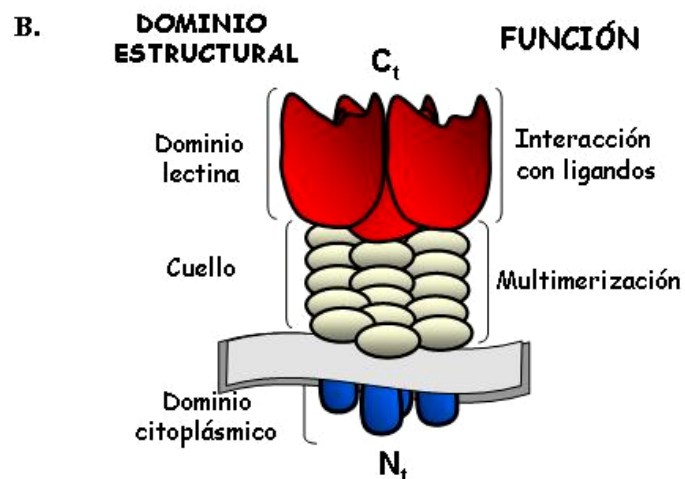


Figura 8.- Estructura génica y dominios estructurales de CD23. **A.** Esquema de la estructura génica donde se representan los exones (números romanos), el inicio de la transcripción (+1), y la extensión de cada exón (encima de los extremos de cada uno). **B.** Esquema representativo de los dominios estructurales de DC-SIGN y sus funciones. (TM, transmembrana; Ct, extremo carboxilo-terminal; Nt, extremo amino-terminal).

transcripción de manera dependiente del tipo celular. CD23a se expresa constitutivamente en células B, mientras que CD23b es inducible por IL-4 en células B y monocitos, y además está presente en macrófagos y eosinófilos [159]. CD23 contiene un motivo EPT en el dominio lectina, lo que le confiere especificidad por galactosamina, y concretamente por cadenas de carbohidratos que contengan estructuras de Gal-GalNAc o GalNAc. CD23 reconoce el dominio C ϵ 3 de la IgE de manera independiente de la glicosilación del ligando [160]. Otros ligandos de CD23 son CD21 [161], CD11b/CD18, CD11c/CD18 [110] y el receptor de vitronectina [162]. El cuello de CD23 contiene un motivo de "cremallera de leucinas" y está implicado en la trimerización de la molécula [52] (**Figura 8**). La oligomerización de CD23 juega un papel importante en la función de esta lectina, ya que el empleo de anticuerpos contra la región del cuello bloquea la interacción de alta avididad de CD23 con IgE, y afecta al control de la producción de IgE [163].

CD23 es la única de las lectinas de este *cluster* para la que se ha detectado una forma soluble. La unión de la forma soluble de CD23 a CD21 incrementa la síntesis de IgE [161], mientras que la unión de IgE a CD23 de membrana reduce la síntesis de IgE, lo que se interpreta como un mecanismo de retro-alimentación negativo. De acuerdo con esta interpretación, los ratones deficientes en CD23 tienen mayor nivel de IgE en suero, mientras que aquellos que sobre-expresan CD23 muestran una síntesis de IgE menor [164]. La forma soluble de CD23 está presente en el suero de individuos sanos, aunque sus niveles son mayores en personas con enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide, asma) y linfoproliferativas. Las actividades contradictorias de CD23 en la regulación de IgE pueden ser atribuidas a las diferentes propiedades de las formas soluble o de membrana. Se ha postulado que la falta de CD23 de membrana provoca la pérdida del mecanismo de retro-alimentación negativo sobre la síntesis de IgE y que las formas solubles generadas promueven una mayor producción de IgE, resultando en un incremento en los niveles de IgE [165].

La forma transmembranal de CD23 humano puede ser proteolizada en cuatro posiciones, originándose formas solubles de 25, 27-29, 33 y 37 kDa. Entre los responsables de esta proteólisis se encuentran metaloproteasas como ADAM10 y ADAM8 [166-168] y alérgenos como Der p 1 (glicoproteína del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* con actividad cisteín-proteasa) [165, 169]. Las formas solubles de CD23 también activan a los monocitos, provocando la producción de mediadores proinflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α [162, 170, 171]. Por otra parte, anticuerpos contra la región del cuello favorecen también la proteólisis de CD23. Por contra, anticuerpos contra el dominio lectina, al igual que la IgE, protegen del corte y estimulan su endocitosis [170].

4. LSEctin

LSEctin, acrónimo de “liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin”, se conoce también con el nombre de CLEC4G. El gen que codifica para esta lectina se encuentra en el cromosoma 19p13.2, localizado entre los genes de DC-SIGN y CD23, y con la misma orientación. El gen de LSEctin codifica para una proteína de 293 aminoácidos organizados en un dominio lectina, seguido por 110 residuos correspondientes a la región del cuello, una región transmembrana y un dominio citoplásmico (**Figura 9**) [172]. A pesar de la alta homología de LSEctin con DC-SIGN/DC-SIGNR, su cuello no incluye dominios repetidos como los encontrados en sus homólogos, pero contiene dos putativos sitios de N-glicosilación (aminoácidos 73 y 159). Estructuralmente el gen de LSEctin consta de 9 exones. El exón 1 y comienzo del exón 2 codifican para el dominio citoplásmico, y la región transmembrana deriva del exón 2. A diferencia de DC-SIGN, el cuello está codificado por varios exones (3, 4, 5 y 6), mientras que los tres últimos exones (7, 8 y 9) dan lugar al dominio lectina, tal y como ocurre con DC-SIGN y otras lectinas (**Figura 10**).

TGCATCGCC	ATG	SACACCACCAGGTACAGCAAGTGGGGCGGCAGCTCCGAGGAGGTCCCC																				
M	D	T	T	R	V	S	K	W	G	G	S	S	E	E	V	P	017					
CGAGGGCCCTCGGGACCCCTGGCTGC	ACTGGAGCAGGAGACCCCTCTTCTTGGCCCTGGCT																					
G	G	P	W	G	R	F	V	H	F	S	R	R	P	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	037
GTCTGGTCACCAAGTCC	TTTGGGCTGTGATTCTGAGTATCCTATTGTCC	AAGGCCTCC																				
<u>V</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>		057	
ACGGAGCGCGCGCTGCTT	GACGGCCACGACCTGCTGAGGACAAACGCCTCGAAGCAG																					
T	E	R	A	A	L	L	D	G	H	D	L	L	R	T	N	A	S	K	Q		077	
ADGGGGCGCTGGGTGCCCT	GAAGGAGGAGGTGGAGACTGCCACAGCTGCTGCTCGGGG																					
T	A	A	L	G	A	L	K	E	E	V	G	D	C	H	S	C	C	S	G		097	
ADCGAGCGCAGCTGCAGAD	CACGGCGGGAGCTTGGGGAGGGCAGGCGAAGCTGAT																					
T	Q	A	Q	L	Q	T	T	R	A	E	L	G	E	A	Q	A	K	L	R		117	
GAGCAGGAGAGCCCTCG	GGGAAGTGGTGAGCGCGTGACCCAGGGCTTGGCTGAAGCC																					
E	Q	E	S	A	L	R	E	L	R	E	R	V	T	Q	G	L	A	E	A		137	
GGCAGGGCGCGTGAGGAC	GTCCGCACTGAGCTGTTCCGGCGCTGGAGGCCGTGAGGCTC																					
G	R	G	R	E	D	V	R	T	E	L	F	R	A	L	E	A	V	R	L		157	
CAGAACAACCTCCGGAG	CGGTGCCCAAGTGGCTGGCTTTCGAGGGCTCCTGCTAC																					
Q	N	N	S	C	E	P	C	P	L	S	W	L	S	E	E	G	S	C	L		177	
TTTTCTCTGTGCCAAAG	ACGAGTGGGGCGGGCGCAGGATCACTGCCAGATGCCAGC																					
E	E	S	V	P	K	I	T	Y	A	A	A	Q	D	H	C	A	D	A	S		197	
GCGCACCTGGTGATCGT	TGGGGGCGTGGATGAGCAGGGCTTCCCTCACTCGGAACACGGT																					
<u>A</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>R</u>		217	
GGCGTGGTACTGGCTGG	CCCTGAGGGCTGTGCCCATCTGGGCAAGGTTTCAGGGCTAC																					
<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>		237	
CAGTGGGTGGACGGAGT	CTCTCAGCTTCAGCCACTGGAACAGGGAGAGCCCAATGAC																					
<u>Q</u>	<u>W</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>D</u>		257	
GCTTGGGGCGCGAGA	ACTGTGCATGATGCTGCACACGGGGCTGTGGAACGACGCACCG																					
<u>A</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>P</u>		277	
TGTGACAGCGAGAAGG	ACGGCTGGATCTGTGAGAAAAGGCACAACTGCTGA	CCCCGCCCA																				
<u>C</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	*				293		
GTCCCTGGAGCCGCGCC	ATTGCAGCATGTGATCTCTGGGGCTGCTCACCTCCCTGG																					
CTCCTGGAGCTGATTGCC	AAAGAGTTTTTCTTCTCATCCACCGCTGCTGAGTCTCAGA																					

Figura 9.- Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de LSEctin. Los posibles sitios de glicosilación aparecen en letra cursiva y sombreados. La región transmembrana y el CTLD se muestran subrayados con línea continúa y discontinua, respectivamente. La región rica en leucinas aparece punteada y el motivo basado en tirosina está enmarcado y sombreado [172].

Como CD23, DC-SIGN y DC-SIGNR, LSECTin es una lectina tipo II de membrana que comparte los 14 aminoácidos invariantes y 16 de los 18 aminoácidos altamente conservados empleados para definir el CRD de una lectina tipo C. La región del dominio lectina de LSECTin también posee todos los residuos implicados en el sitio #2 de unión a calcio y dos de los cuatro aminoácidos del sitio #1 de unión a calcio [172]. LSECTin contiene un motivo EPN en el sitio #2 de unión a calcio, lo que sugiere el reconocimiento de manosa y N-Acetil-Glucosamina [55].

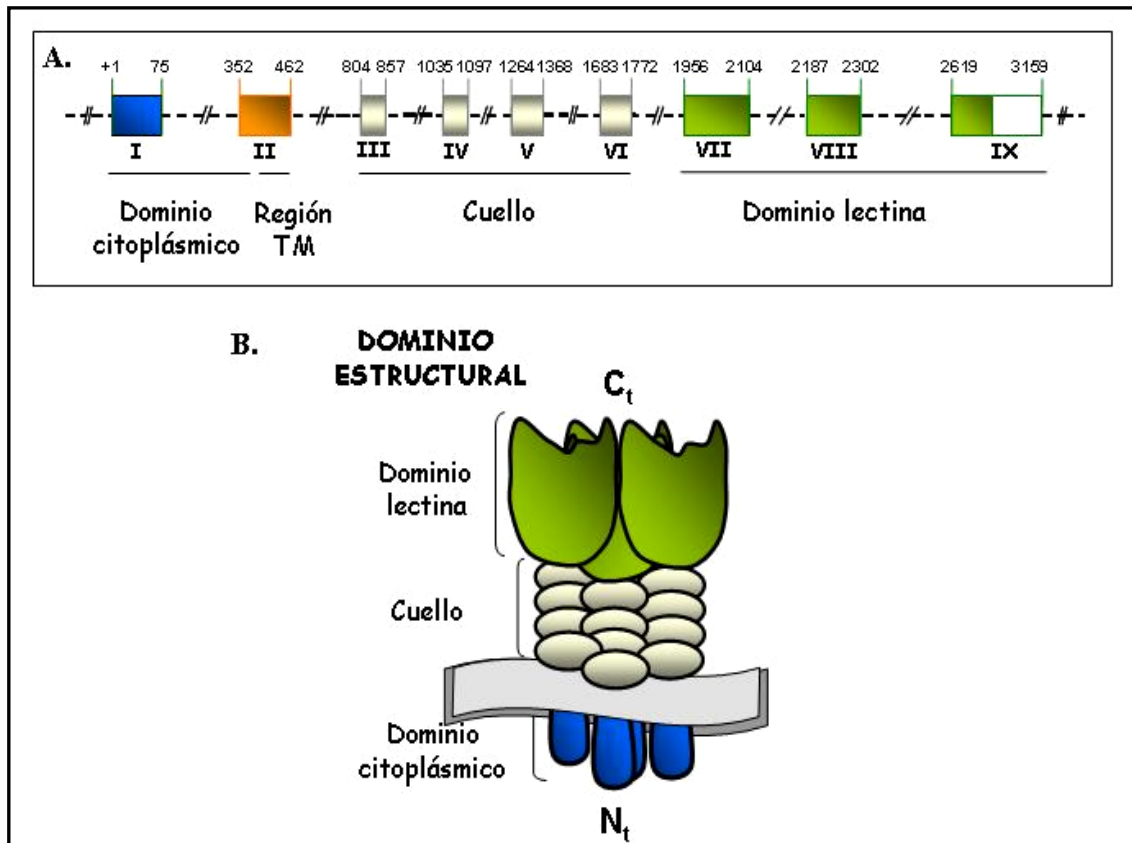


Figura 10.- Estructura génica y dominios estructurales de LSECTin. A. Esquema de la estructura génica donde se representan los exones (números romanos), el inicio de la transcripción (+1), y la extensión de cada exón (encima de los extremos de cada uno). B. Esquema representativo de los dominios estructurales de LSECTin. (TM, transmembrana; Ct, extremo carboxilo-terminal; Nt, extremo amino-terminal).

LSECTin fue descrita a comienzos de 2004 por Liu y colaboradores como una lectina tipo C expresada en células endoteliales de sinusoides hepáticos y de nódulo linfático, y con capacidad de unir manosa, fucosa y N-Acetil-Glucosamina, pero no galactosamina [172]. Sin embargo, la especificidad de esta lectina aún no está bien definida, ya que según algunos autores la interacción de LSECTin con determinadas glicoproteínas no es inhibible por manano [173]. Recientemente resultados de *glycoarrays* realizados con LSECTin recombinante han demostrado su capacidad de interactuar con glicoproteínas terminadas en GlnNAc β 1-2Man [174]. Como resultado de la unión selectiva de estos disacáridos, LSECTin poseería capacidad de reconocimiento de complejos truncados y azúcares "tipo N". LSECTin reconoce la glicoproteína

GP1 del virus Ébola (filovirus), así como la proteína S del coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), lo que la convierte en otra lectina con capacidad de reconocimiento de patógenos [173].

La presencia de elementos reguladores mieloide-específico en la región reguladora proximal del gen de LSECtin nos indujo a pensar que esta lectina podría expresarse en células mieloides, lo que ha constituido uno de los objetivos del presente trabajo.

5. DC-SIGN

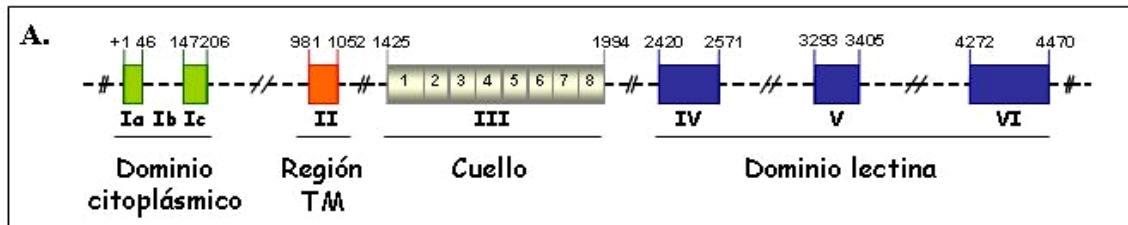
5.1 EXPRESIÓN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

DC-SIGN (acrónimo de "Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin") o CD209 /CLEC4L fue descubierta en 1992 por Curtis y colaboradores como una lectina tipo C con capacidad de unir la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) [175]. Sin embargo, no fue hasta 2000 cuando se re-bautizó con el nombre de DC-SIGN por su capacidad de mediar interacciones de células dendríticas con linfocitos T de forma ICAM-3 dependiente y LFA-1 independiente [106].

Aunque originalmente se describió como una lectina de expresión restringida a células dendríticas, DC-SIGN se expresa en otros tipos celulares dentro del linaje mieloide. DC-SIGN se expresa *in vivo* en células dendríticas de tejidos periférico y linfoides [106], así como en determinadas poblaciones CD14+ de sangre periférica [65]. Además, se ha detectado la expresión de DC-SIGN en subpoblaciones de macrófagos (alveolares, sinoviales y de placenta) [176, 177]. DC-SIGN se induce por IL-4 *in vitro* durante la generación de células dendríticas derivadas de monocitos [106, 178, 179], así como durante la activación alternativa de macrófagos [180] y durante la diferenciación de células THP-1 en presencia de activadores de proteína-kinasa C (PKC) [180]. En cuanto a su localización subcelular, DC-SIGN se localiza en *lipid raft*, microdominios de membrana ricos en colesterol, lo que podría ser importante para la unión/internalización de partículas virales y para su capacidad de iniciar señalización intracelular [97, 181].

Desde un punto de vista estructural, DC-SIGN es una proteína transmembranal tipo II de 404 aminoácidos. Su estructura prototípica consta de un dominio lectina, un cuello que le separa de la región transmembrana y una pequeña cola citoplásmica. Además de esta estructura prototípica, existen numerosas isoformas generadas por procesamiento alternativo [179]. Su

dominio lectina mantiene los dos sitios de unión a calcio y presenta un motivo EPN dentro del sitio #2 de unión a calcio, lo que le otorgaría especificidad por manosa. Además de reconocer estructuras manosiladas, DC-SIGN reconoce carbohidratos que contienen fucosa, monosacárido presente en diferentes conformaciones en los antígenos de los grupos sanguíneos de Lewis (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b) [182, 183]. El cuello de DC-SIGN, a diferencia del de otras lectinas, está compuesto por 8 dominios repetidos codificados en un solo exón. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que se trata de una región fundamental para la formación de estructuras multiméricas, consiguiéndose así una mayor avidéz por los ligandos [184, 185]. La zona amino terminal conforma la cola citoplásmica y contiene tres dominios destacables: un motivo dileucina (LL) implicado en la rápida internalización de la lectina tras interactuar con su ligando, un dominio triacídico (EEE) que determina la dirección hacia compartimentos lisosomales de los complejos DC-SIGN-ligando [156, 186] y un motivo basado en tirosina (ITIM-like) que parece otorgarle la capacidad de transmitir señales [97] (**Figura 11**).



Aunque todavía no se conoce con exactitud cómo las lectinas tipo C transmiten las señales al interior de las células dendríticas, la presencia de estos motivos basados en tirosinas en los dominios citoplásmicos de ciertos miembros de esta familia hace pensar que son capaces de iniciar cascadas de señalización, que en algunos casos interfieren con las disparadas por los TLRs [94, 95, 99]. El caso de DC-SIGN, junto con el de Dectin-1, es uno de los más estudiados hasta la fecha [63, 64, 97]. El trabajo de

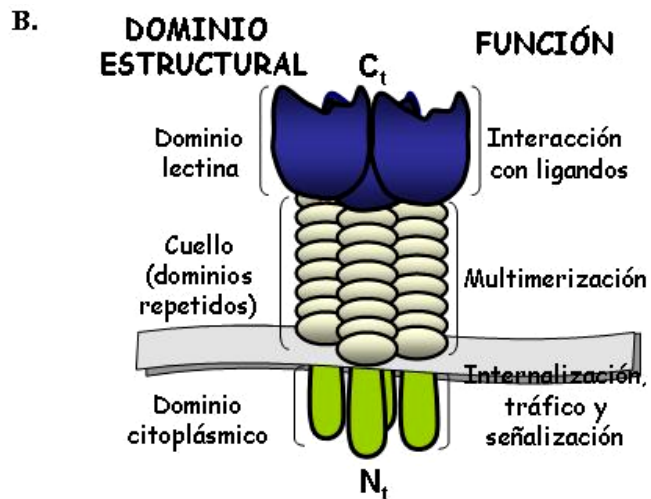


Figura 11.- Estructura génica y dominios estructurales de DC-SIGN. A. Esquema de la estructura génica donde se representan los exones (números romanos), el inicio de la transcripción (+1), y la extensión de cada exón. B. Esquema representativo de los dominios estructurales de DC-SIGN y sus funciones. (TM, transmembrana; Ct, extremo carboxilo-terminal; Nt, extremo amino-terminal).

Caparrós y colaboradores desveló que la ligación de DC-SIGN con anticuerpos específicos frente al dominio lectina induce la fosforilación de ERK1/2 y Akt sin producir activación de p38MAPK ni maduración de células dendríticas. En este mismo trabajo se demuestra también que la

activación de DC-SIGN dispara la fosforilación de PLC- γ e incrementos transitorios de los niveles de Ca^{2+} intracelular. La relevancia de las señales iniciadas por DC-SIGN se ha puesto de manifiesto en células dendríticas derivadas de monocitos, al comprobarse que la ligación de DC-SIGN sinergiza con TNF- α y LPS en la producción de IL-10, lo que sugiere una comunicación entre las señales intracelulares disparadas desde DC-SIGN y desde los TLRs [97]. Un trabajo posterior ha confirmado que la activación de DC-SIGN (vía anticuerpo específico o HIV) preserva el fenotipo inmaduro de las células dendríticas y altera la producción de citoquinas Th1, creándose un ambiente favorable para el patógeno [63]. Por otra parte, un trabajo reciente ha demostrado que la unión de ligando a DC-SIGN junto con la activación de TLR en células dendríticas activa la quinasa Raf-1, produciéndose la posterior acetilación de la subunidad p65 de NF- κ B y finalmente un incremento en la expresión de IL-10. Por lo tanto, la ruta de señalización dependiente de DC-SIGN influye en las funciones de las células dendríticas sólo en el caso de que éstas reconozcan los patógenos a través de TLR [64]. Todos estos trabajos sugieren que las señales intracelulares disparadas desde DC-SIGN modulan la maduración de DC y proporcionan una explicación a la capacidad de los patógenos que interactúan con DC-SIGN de alterar el balance Th1/Th2.

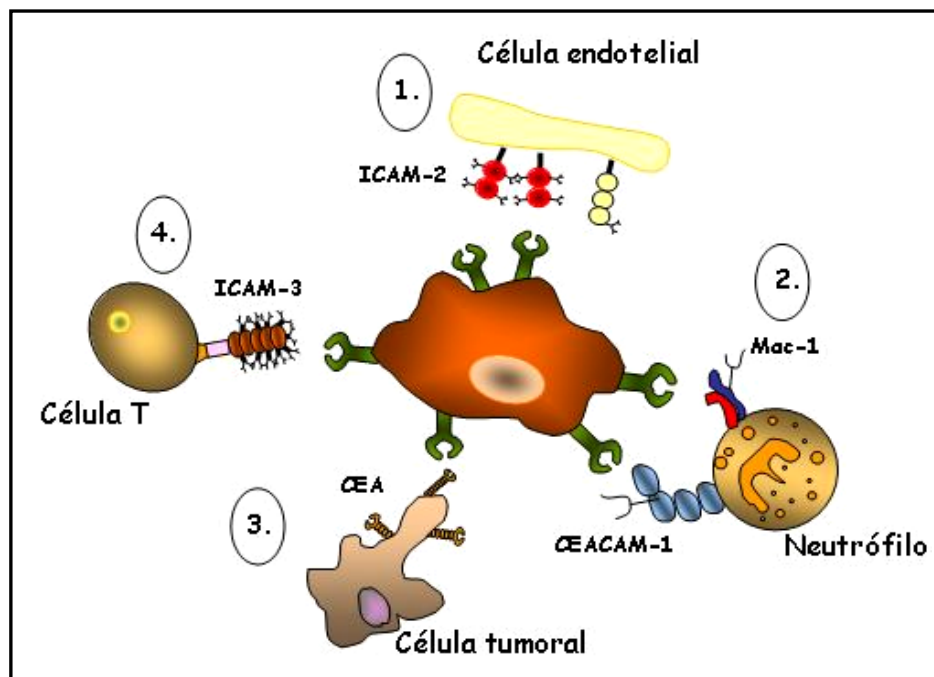


Figura 12.- Ligandos endógenos de DC-SIGN. Representación esquemática de las interacciones entre DC-SIGN presente en células dendríticas y sus ligandos endógenos. 1.- El rodamiento y la migración transendotelial de células DC-SIGN⁺ están mediados por las interacciones entre DC-SIGN e ICAM-2 expresado en las células endoteliales. 2.- Unión de las células dendríticas a neutrófilos gracias al reconocimiento de DC-SIGN por carbohidratos presentes en las moléculas CEACAM1 y Mac-1. 3.- El antígeno carcinoembrionario expresado en la superficie de las células tumorales es reconocido por DC-SIGN. 4.- Los contactos iniciales entre las células dendríticas y las células T están mediados por la interacción transitoria entre DC-SIGN e ICAM-3.

En cuanto a su función, DC-SIGN participa en procesos de reconocimiento de moléculas propias, captación antigénica e interacción célula-célula. Para llevar a cabo estas funciones DC-SIGN cuenta con la capacidad de reconocer ligandos endógenos (**Figura 12**). Concretamente, DC-SIGN participa en la migración transendotelial de las células dendríticas gracias a la interacción con ICAM-2 presente en células endoteliales [65]. La unión de células dendríticas a neutrófilos tiene lugar gracias al reconocimiento por DC-SIGN de los carbohidratos ricos en Le^x de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) [107, 109] y de CEACAM-1 [109, 187]. DC-SIGN también reconoce el antígeno carcinoembrionario (CEA) de células de cáncer colorrectal, caracterizado por una mayor glicosilación y presencia de Le^x y Le^y [108]. Otro de los ligandos endógenos reconocidos por DC-SIGN es ICAM-3. Aunque Geijtenbeek y sus colaboradores propusieron un modelo en el que la interacción inicial entre células dendríticas y linfocitos T vírgenes estaría mediada por la interacción de DC-SIGN/ICAM-3 [106], otros autores no han podido corroborar esta hipótesis, existiendo controversia al respecto [188-190].

	PATÓGENO	Ligando de DC-SIGN
Virus	HIV-1	gp120
	CMV	gB
	Ébola	GP de la envuelta
	Margburg	GP de la envuelta
	Dengue	gE
	HCV	gE1/gE2
	Virus SARS	proteína S
	<i>Herpesvirus humano</i>	?
Bacterias	Cepas patogénicas de <i>Mycobacterium</i>	ManLAM
	<i>Helicobacter pylori</i>	LPS
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LPS
	<i>Lactobacillus</i>	?
Parásitos	<i>Leishmania</i>	LPG?
	<i>Schistosoma mansoni</i>	SEA
Hongos	<i>Candida albicans</i>	?
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Galactomanano

Tabla 4.- Patógenos que se unen a DC-SIGN y estructuras que median dicho reconocimiento. (HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; CMV, citomegalovirus; HCV, virus de la hepatitis C; SARS, síndrome respiratorio agudo severo; gB, gE, gE1, gE2, glicoproteínas B, E, E1, E2; GP, glicoproteína; LPG, lipofosfoglicano; LPS, lipopolisacárido; ManLAM, lipoarabinomanano recubierto de manosas; SEA, antígeno soluble de los huevos de *Schistosoma mansoni*; Le^x, Lewis^x; Le^y, Lewis^y).

DC-SIGN además de unir ligandos endógenos y participar en el ciclo biológico de las dendríticas, funciona como receptor de antígenos y patógenos. La interacción de esta lectina con sus PAMPs lleva a la internalización del complejo DC-SIGN-patógeno y su posterior procesamiento y presentación antigénica, para acabar poniendo en marcha respuestas inmunes

frente a esos microorganismos [68, 186]. DC-SIGN es probablemente la lectina con el rango más amplio de ligandos patogénicos [87], siendo capaz de unir PAMPs presentes en bacterias [99, 191], hongos [192, 193], parásitos [194] y virus [175, 195, 196] (**Tabla 4**).

5.2 HOMÓLOGOS MURINOS DE DC-SIGN

Durante los últimos años se ha intentado localizar el “ortólogo funcional” murino de DC-SIGN humano, principalmente por su utilidad como modelo para el estudio de las capacidades funcionales de DC-SIGN. Sin embargo, y a pesar de la existencia de numerosas moléculas murinas homólogas a DC-SIGN, actualmente ninguna de ellas es considerado el ortólogo de DC-SIGN humano. Los genes que codifican para los distintos homólogos de DC-SIGN están localizados en un región de 3.5 megabases dentro del cromosoma 8 de ratón, adyacentes a los genes que codifican para mCD23 y mLSEctin (**Figura 13**). Cinco de estos genes fueron ya descritos por Park y colaboradores en 2001 y denominados como mDC-SIGN (*murine DC-SIGN*) o SIGNR5, SIGNR1 (*SIGN related*), SIGNR2, SIGNR3 y SIGNR4 [103], mientras que recientemente se han identificado tres genes nuevos que codifican para SIGNR6 (pseudogen), SIGNR7 y SIGNR8 [104].

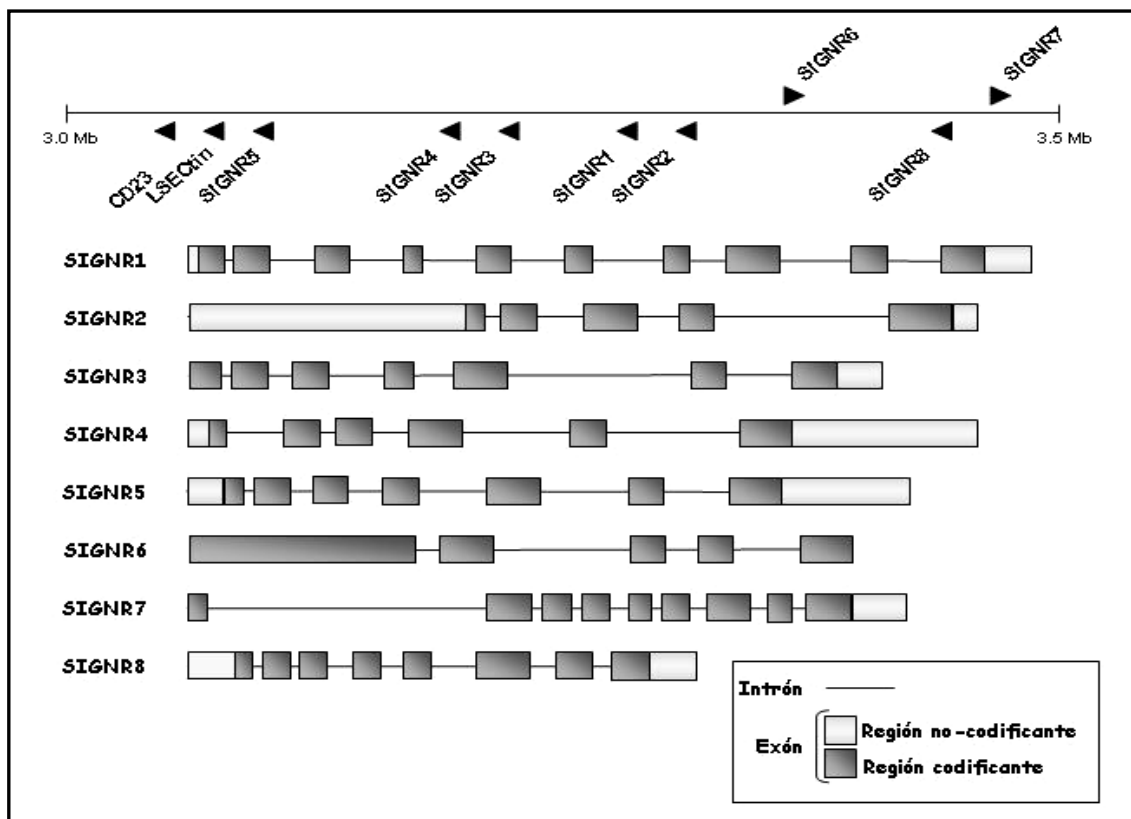


Figura 13.- Organización del grupo de genes SIGNR murinos. Mapa de la región del cromosoma 8 de ratón y estructura génica de los ocho homólogos de DC-SIGN en ratón.

Estructural y funcionalmente, los SIGNR presentan ciertas diferencias con sus homólogos humanos (**Figura 14**). Mientras el dominio CRD muestra homología entre todos ellos, la región del cuello, sin dominios repetidos y relativamente más corta que la presente en DC-SIGN humano, es la principal característica diferencial. En cuanto al reconocimiento de azúcares, sólo SIGNR3 comparte con DC-SIGN humano la capacidad de unir azúcares con terminaciones ricas en manosa y fucosa, mientras otro homólogo como SIGNR7 es único en la capacidad de unir sulfo-sialil-Lexis^x [104]. Algunos estudios han demostrado que tanto SIGNR1 como SIGNR3 presentan actividad endocítica, aunque sólo SIGNR3 contiene un motivo de internalización basado en tirosina [104, 197]. Por todas las características mencionadas anteriormente, se postula que SIGNR3 es la proteína con mayor homología con DC-SIGN humano, mientras que SIGNR5, originalmente descrito como el ortólogo murino de DC-SIGN, presenta mayor similitud en algunos aspectos con DC-SIGN humano [104].

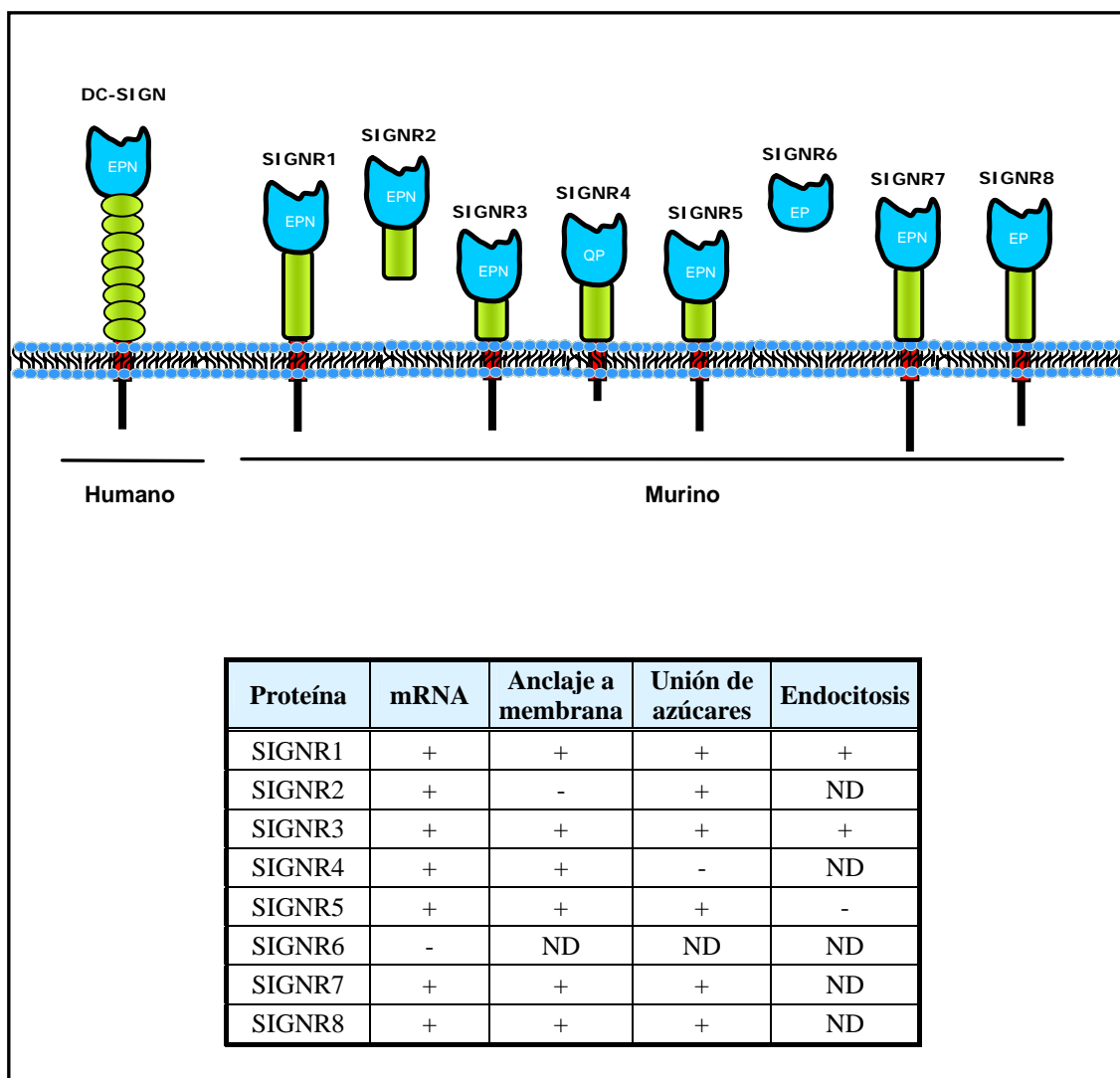


Figura 14.- Características principales de los SIGN murinos y DC-SIGN humano. Arriba, Modelo esquemático de los dominios estructurales. Abajo, resumen de las propiedades de los SIGN murinos.

5.3 REGIÓN REGULADORA PROXIMAL DEL GEN DE DC-SIGN Y POLIMORFISMOS ASOCIADOS

Dada la relevancia funcional de DC-SIGN y la importancia clínica de los patógenos que reconoce, numerosos investigadores han abordado el estudio de la presencia de variantes polimórficas, tanto en la región codificante como reguladora, y su relación con la susceptibilidad a determinadas infecciones. En cuanto a polimorfismos en la región codificante del gen de DC-SIGN, se han localizado principalmente en el exón 4 que codifica para el cuello y se han identificado 5 alelos que se corresponden con isoformas de DC-SIGN con 9, 7, 6 y 5 dominios repetidos y otro en el cual la Ser 210 está sustituida por Phe [198]. El trabajo de Liu y colaboradores puso de manifiesto que individuos heterocigotos para el cuello (un alelo normal con 8 dominios repetidos, y otro con un número diferente de dominios repetidos) presentan menor susceptibilidad a la infección por HIV [199]. En este trabajo se analizaron 94 individuos seronegativos expuestos en repetidas ocasiones a la infección por HIV (denominados ES) frente a 316 seropositivos y 425 seronegativos, y se observó que la frecuencia de heterocigosis para el cuello de DC-SIGN es mayor en los ES que en los seropositivos. En consecuencia, los autores asociaron la presencia de variaciones en el número de repeticiones del cuello a una mayor resistencia a la infección por HIV [199].

Por otra parte, aunque se sabe de la existencia de numerosos polimorfismos en la región 5' del gen de DC-SIGN, la mayoría de los estudios se han centrado en DC-SIGN-336 (variante G o A) dentro de la región promotora [200]. Según Sakuntabhai y colaboradores, la variante G muestra una mayor capacidad de unión del factor de transcripción Sp1 comparado con la variante A [198], aunque es probable que este polimorfismo no afecte a la expresión tejido-específica, controlada en principio a través de otras regiones del promotor [200]. Este mismo grupo observó que la variante G (DC-SIGN-336G) está asociada a una mayor protección frente a la fiebre del Dengue, pero no contra la fiebre hemorrágica del Dengue en individuos de Tailandia [198]. Además de la asociación del polimorfismo DC-SIGN-336 con la progresión de Dengue, existen otros trabajos que también relacionan este polimorfismo con la susceptibilidad a tuberculosis. Concretamente, el trabajo de Barreiro y colaboradores concluyó que las variantes -336A y -871G confieren protección frente a la tuberculosis en una población del sur de Africa [201]. Dichos autores sugieren que la alta prevalencia de la variante -336A (asociada a una mayor expresión de DC-SIGN) en individuos sanos podría estar asociada a una mayor eficacia de las células fagocíticas (células dendríticas y macrófagos DC-SIGN⁺) en el control de la tuberculosis [201]. Por el contrario, un trabajo posterior realizado sobre población sub-Sahariana mostraba la asociación entre la variante -336G y una mayor protección frente a la tuberculosis, sugiriendo en este caso que los menores niveles de DC-SIGN protegerían contra la

tuberculosis [202]. Esta discrepancia puede deberse a las diferentes poblaciones estudiadas en los distintos trabajos e incluso a la existencia de otros polimorfismos. Trabajos posteriores no observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos DC-SIGN-336 en pacientes colombianos [203], ni tunecinos [204] afectados de tuberculosis con respecto a los individuos control.

Varios grupos han estudiado la posible asociación entre los polimorfismos de la región promotora de DC-SIGN y la infección por HIV. Un estudio realizado sobre población Europea-Americana ha mostrado la existencia de una asociación entre la variante DC-SIGN-336G y una mayor susceptibilidad a la infección por HIV-1 por vía parenteral, pero no así para el caso de la infección por vía mucosa [205]. Por otra parte, aunque otro grupo no encontró diferencias significativas en la frecuencia alélica DC-SIGN-336C entre pacientes progresores y lentos-progresores, sí observó una asociación entre otra variante polimórfica (DC-SIGN-139C) y una progresión del SIDA acelerada en individuos hemofílicos japoneses infectados por HIV-1 [206]. Por otra parte, no se ha encontrado asociación entre la variante DC-SIGN-336 A/G y la susceptibilidad a la enfermedad celíaca, aunque la variante DC-SIGN-336G sí parece estar asociada a la enfermedad celíaca dentro del grupo de paciente HLA-DQ2(-) [207].

Además de estas variantes polimórficas estudiadas, poco más se sabe sobre la región reguladora proximal del gen de DC-SIGN y su regulación transcripcional. La única información disponible acerca de esta región promotora la aportaron Liu y colaboradores en 2003 en un trabajo en el que los autores se limitaron a identificar posibles sitios de iniciación de la transcripción, que pasaron a denominar como +1, +271, +364 y +435, considerando la posición +488 como el inicio de la traducción (ATG). Sin embargo, el análisis de las secuencias mínimas requeridas para el funcionamiento del promotor de DC-SIGN reveló que la región promotora proximal del gen de DC-SIGN estaba contenida entre las posiciones +251/+487 [200].

El hecho de que mayores niveles de expresión de DC-SIGN lleven a una mayor agregación homotípica, mayor unión de ICAM-3 y mayor capacidad de unión de patógenos demuestra la importancia de los mecanismos de control de la expresión de DC-SIGN a nivel transcripcional, y por tanto, hace necesario un mayor conocimiento sobre la regulación transcripcional de este gen. De esta forma, alteraciones en la regulación del gen de DC-SIGN podrían, en último caso, afectar a la infección y progresión de enfermedades infecciosas causadas por patógenos reconocidos por esta lectina. Esta es una de las razones por la que el presente trabajo ha abordado el estudio de los factores de transcripción y elementos de DNA que controlan la expresión basal y tejido-específica del gen de DC-SIGN.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis consistió en el análisis de la regulación de la expresión de las lectinas codificadas en el *cluster* de genes del cromosoma 19p13.2, DC-SIGN y LSEctin, y en el estudio de las funciones de LSEctin. En concreto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Analizar la expresión de LSEctin en células del linaje mieloide y su inducibilidad por IL-4.
- 2.- Determinar la existencia de isoformas de LSEctin, así como su especificidad de reconocimiento de azúcares.
- 3.- Analizar las funciones de LSEctin en relación a las de DC-SIGN.
- 4.- Identificar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de DC-SIGN y LSEctin.

RESULTADOS

Esta Tesis se presenta en el formato de artículos publicados. La sección de resultados es una sucesión de artículos que contienen las respuestas a los objetivos específicos planteados. Algunos de los objetivos establecidos inicialmente han sido abordados en más de un artículo, de tal forma que:

I.- Los resultados relativos al análisis de la expresión de LSECtin en células del linaje mieloide y su inducibilidad por IL-4 se muestran en los siguientes artículos:

- Domínguez-Soto A, *et al.*, **The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells.** *Blood*, 109:5337-45, 2007.
- Domínguez-Soto A, *et al.*, **LSECtin is expressed in Kupffer cells and its expression is regulated by PU.1.** *Manuscrito en preparación.*

II.- Los resultados obtenidos sobre la estructura, especificidad y funciones de LSECtin aparecen en el siguiente artículo:

- Domínguez-Soto A, *et al.*, **The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells.** *Blood*, 109:5337-45, 2007.

III.- Los resultados relativos al estudio de la regulación de la expresión de DC-SIGN y LSECtin, así como la identificación de los factores de transcripción implicados en la regulación transcripcional de ambas lectinas, forman parte de dos de los artículos presentados en esta Tesis:

- Domínguez-Soto A, *et al.*, **PU.1 binds to and regulates the activity of the proximal regulatory region of the DC-SIGN gene.** *J. Biol. Chem.*, 280:33123-31, 2005.
- Domínguez-Soto A, *et al.*, **LSECtin is expressed in Kupffer cells and its expression is regulated by PU.1.** *Manuscrito en preparación.*

1.- LSEctin media captura antigénica y unión de patógenos en células mieloides humanas.

LSEctin (“Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin”, CLEC4G) es una lectina tipo C codificada en el genoma junto a DC-SIGNR/DC-SIGN/CD23. Aunque LSEctin se describió como molécula propia de células endoteliales sinusoidales de nódulo linfático e hígado, este trabajo describe que LSEctin se expresa en células dendríticas de sangre periférica y células mieloides tímicas aisladas *ex vivo*. LSEctin también se detecta en células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos a nivel de RNA mensajero y proteína. *In vitro*, la interleuquina-4 induce la expresión de tres isoformas de LSEctin generadas mediante procesamiento alternativo, incluyendo una forma potencialmente soluble ($\Delta 2$) y una forma más corta ($\Delta 3/4$) con respecto a la forma prototípica. LSEctin funciona como receptor de patógenos, ya que su expresión confiere a células leucémicas K562 la capacidad de unir el virus Ébola. Estudios de reconocimiento de azúcares indican que LSEctin reconoce específicamente N-Acetil-Glucosamina, mientras no es capaz de unirse a matrices que contienen manano o N-Acetil-Galactosamina. La unión de un ligando o anticuerpo específico para LSEctin desencadena su rápida internalización, proceso que depende de los motivos tirosina y diglutámico presentes en la región citoplásmica. Por tanto, LSEctin puede considerarse como un receptor de patrones moleculares asociados a patógenos de células mieloides humanas. Además nuestros resultados sugieren que LSEctin participa en la captación e internalización de antígenos, y podría ser una molécula de interés para su empleo en protocolos de vacunación.

The DC-SIGN-related lectin LSECTin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells

Angeles Dominguez-Soto,¹ Laura Aragonese-Fenoll,¹ Enrique Martin-Gayo,² Lorena Martinez-Prats,³ Maria Colmenares,¹ Marisa Naranjo-Gomez,⁴ Francesc E. Borrás,⁴ Pilar Munoz,⁵ Mercedes Zubiaur,⁵ Maria L. Toribio,² Rafael Delgado,³ and Angel L. Corbi¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid; ²Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid; ³Hospital Doce de Octubre, Madrid; ⁴Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona; ⁵Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain

Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin (LSECTin [CLEC4G]) is a C-type lectin encoded within the liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (L-SIGN)/dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)/CD23 gene cluster. LSECTin expression has been previously described as restricted to sinusoidal endothelial cells of the liver and lymph node. We now report LSECTin expression in human peripheral blood and thymic dendritic cells isolated ex vivo. LSECTin is also detected in monocyte-derived

macrophages and dendritic cells at the RNA and protein level. In vitro, interleukin-4 (IL-4) induces the expression of 3 LSECTin alternatively spliced isoforms, including a potentially soluble form ($\Delta 2$ isoform) and a shorter version of the prototypic molecule ($\Delta 3/4$ isoform). LSECTin functions as a pathogen receptor, because its expression confers Ebola virus-binding capacity to leukemic cells. Sugar-binding studies indicate that LSECTin specifically recognizes N-acetylglucosamine, whereas no LSECTin binding to Mannan- or N-acetyl-galactosamine-containing matrices are observed. Anti-

body or ligand-mediated engagement triggers a rapid internalization of LSECTin, which is dependent on tyrosine and diglutamic-containing motifs within the cytoplasmic tail. Therefore, LSECTin is a pathogen-associated molecular pattern receptor in human myeloid cells. In addition, our results suggest that LSECTin participates in antigen uptake and internalization, and might be a suitable target molecule in vaccination strategies. (Blood. 2007;109:5337-5345)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

The identification of the lectin gene cluster at chromosome 19p13.2¹ has led to the realization that some C-type lectins are capable of mediating intercellular adhesion, pathogen-binding, and antigen internalization for induction of T cell responses.² The paradigmatic example of this type of lectin is dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), which efficiently internalizes antigens,³ mediates dendritic cell intercellular adhesions,⁴ and recognizes a wide range of microorganisms through binding to mannose- and Lewis-containing glycans.⁵ C-type lectins on dendritic cells enhance their ability for pathogen recognition⁶ and contribute to modulation of toll-like receptor (TLR)-initiated signals.⁷ Consequently, the definition of the range of dendritic cell lectins and their binding specificities might provide adequate targets for immune intervention and prevention of pathogen entrance and spreading.

The lectin gene cluster at chromosome 19p13.2 includes the genes encoding for the type II C-type lectins DC-SIGN, liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin (L-SIGN), CD23, and liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin (LSECTin).^{1,4,8,9} DC-SIGN is expressed on myeloid dendritic cells,^{4,10} and alternatively activated in vitro on macrophages.¹¹ In vivo it is found on

interstitial dendritic cells,¹² a subset of CD14+ peripheral blood DC,¹³ human microvascular endothelial cells,⁸ and on synovial, placenta, lymph node, and alveolar macrophages.¹⁴⁻¹⁶ By contrast, L-SIGN is exclusively expressed on endothelial cells of the liver, lymph nodes, and placenta,^{17,18} but not on myeloid cells.

The LSECTin (CLEC4G) gene is located between the CD23 and DC-SIGN genes with the three genes arranged in the same orientation.⁹ LSECTin encodes a protein with a lectin domain followed by a 110-residue stalk region, a transmembrane domain, and a 31-residue cytoplasmic domain.⁹ LSECTin has been previously detected on liver and lymph node sinusoidal endothelial cells at the protein and RNA level.⁹ LSECTin functions as an attachment factor for Ebola virus and SARS, but it does not bind HIV or hepatitis C virus.¹⁹ We now describe the expression of LSECTin isoforms in ex vivo isolated human peripheral blood and thymic dendritic cells as well as in dendritic cells and macrophages generated in vitro. LSECTin exhibits ligand-induced internalization, and its sugar recognition specificity differs from that of DC-SIGN. The presence of LSECTin on myeloid cells should therefore contribute to expanding their antigen-capture and pathogen-recognition capabilities.

Submitted September 21, 2006; accepted February 23, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, March 5, 2007; DOI 10.1182/blood-2006-09-048058.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

Materials and methods

The study described was approved by the Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) Institutional Review Board. The study did not involve any direct contact with human subjects.

Cell culture

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures.²⁰ Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocyte-derived dendritic cells (MDDC), monocyte-derived macrophages, and alternatively (AAMØ) or classically (CAMØ) activated macrophages were generated as previously described.^{11,20} Isolation of peripheral blood myeloid dendritic cells (MyDC) was done with a Blood DC isolation kit (MACS; Miltenyi Biotec) with some modifications. First, peripheral blood mononuclear cells were depleted of T cells, NK cells, and monocytic cells by magnetic separation, and the remaining population was incubated with monoclonal antibodies (mAbs) to fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD4, phycoerythrin (PE)-labelled CD11c, PE-Cy5-CD14, and PE-Cy5-CD19 and sorted in a FACS Vantage cell sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). PE-Cy5-positive cells were discarded, and double-positive cells for CD4 and CD11c were sorted as MyDC (CD11c+ BDCA2-CD123-). The purity of the resulting population was confirmed by additional antibody staining.

Human thymic dendritic cells and macrophages were isolated from thymus fragments removed during corrective cardiac surgery of patients aged 1 month to 4 years. After Lymphoprep centrifugation, thymocyte cell suspensions were depleted of T, B, NK cells and CD34+ precursors by magnetic cell sorting (AutoMacs; Miltenyi Biotec) as described.²¹ Macrophages were isolated from the depleted cell fraction by using PE-labeled anti-CD14mAb and anti-PE microbeads, and exhibited a CD13+, CD11c+, CD14+ phenotype. Thymic pDC were isolated from the macrophage-depleted fraction with PE-labeled antiCD123 and antiPE microbeads, and showed a CD11c-, CD13-, BDCA2+, CD123+ phenotype. Thymic MyDC (CD13+, CD11c^{dim}, CD14-) were isolated from the CD123-negative fraction with PE-labeled antiCD13 and anti-PE microbeads. Sorted populations proved to be over 97% pure on reanalysis. Phenotypic analysis was carried out by indirect immunofluorescence as described.²⁰

The K562 (chronic myelogenous leukemia) and THP-1 (monocytic leukemia) cell lines were cultured as described²⁰ and THP-1 differentiation induced with phorbol myristate acetate (PMA) at 10 ng/mL.¹¹ HEK293T and COS-7 cells were grown in Dulbecco modified eagle medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS) and transfected with Superfect (Qiagen, Hilden, Germany). Transfection of the pCDNA3.1(-)-based constructs in K562 cells was accomplished with Superfect or by nucleofection (Amaxa GmbH, Cologne, Germany). Mutation of residues Y⁶ E¹⁴E¹⁵ W²¹GRW²⁴VHW²⁷, and both Y⁶ and E¹⁴E¹⁵ were done by site-directed mutagenesis on LSEctin cDNA cloned in pCDNA3.1(-), which resulted in the generation of LSEctin Y/F, LSEctin EE/AA, LSEctin 3W/3A, and LSEctin DM constructs.

Isolation and detection of LSEctin isoform mRNA in distinct cell types

LSEctin isoforms were isolated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on RNA from MDDC of a healthy donor. Total cellular RNA was isolated with RNeasy columns (Qiagen). Two micrograms of RNA was reverse-transcribed and amplification was carried out on 5 µL of each cDNA synthesis reaction in 50 µL of solution. After a 5 minute denaturation step, LSEctin was optimally amplified after 35 cycles of denaturation (95°C, 45 seconds), annealing (65°C, 30 seconds), and extension (72°C, 90 seconds), followed by a 10-minute extension step at 72°C. Oligonucleotides used for amplification of the coding region of the prototypical LSEctin isoform (LSEctin full-length) were LSEctin sense 5'-GGGAATTCGCTGCATCGCCATGGACACC-3' and LSEctin antisense 5'-CCCAAGCTTGGGGGGGTGACGAGTTGTGC-3'. Amplification of LSEctin isoforms was accomplished using the primer pairs

LSEctin sense/LSEctin antisense, LSEctin Δ3/4sense/LSEctin antisense, and LSEctin Δ2sense/LSEctin antisense. The oligonucleotide LSEctin Δ3/4sense 5'-CCTATTGTCCAAGGGCTCGGG-3' spans through the exon 2/exon 5 junction. Oligonucleotide LSEctin Δ2sense 5'-CCGAGGAGGTC-CCCGGAGCCT-3' spans through the exon 1/exon 3 junction. PCR fragments were resolved in 1.2% agarose gels, purified, cloned, and sequenced. For eukaryotic expression, the selected LSEctin cDNA isoforms were excised from TOPO cloning vectors (Invitrogen, Paisley, UK) with *EcoRI* and *HindIII*, gel purified, and ligated into *EcoRI*- and *HindIII*-digested pCDNA3.1(-). As a control in RT-PCR experiments, GAPDH mRNA was amplified using oligonucleotides 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3' and 5'-CGGCCAT-CACGCCACAGT TTC-3', which together amplify a 417 bp fragment. Images were captured with GelDoc XR (BioRad, Hercules, CA) using Quantity One-4.5.2 software.

Detection and cell-surface distribution of LSEctin

The cDNA region coding for the extracellular portion of LSEctin (residues 55-293) was generated by polymerase chain reaction with the primers 5'-CACGCTCCACGGAGCGCGCGG-3' and 5'-CCCAAGCTT-GGGCGGGTCCAGCA GTTGTGC-3'. The resulting fragment, which contains the neck and lectin domains of LSEctin, was cloned in-frame downstream of the hexahistidine sequence of pET100/D-TOPO (Invitrogen) and sequenced. The resulting vector, as well as a positive control encoding β-galactosidase (pET100/D/lacZ), were transformed into BL21 bacteria, and HIS-LSEctin and HIS-β-gal fusion proteins were purified on Ni²⁺-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen). The purified HIS-LSEctin fusion protein was injected intraperitoneally (three times) into Balb/c mice. After a final intraperitoneal boost, splenocytes were removed and fused to SP2 cells at a 1:1 ratio using PEG 1500 (Sigma, Barcelona, Spain), as described.¹⁰ Screening for anti-LSEctin antibodies was done by enzyme-linked immunosorbent assay using 96-well plates coated with HIS-LSEctin or HIS-β-gal (negative control) fusion proteins. Final selection of the selected hybridoma (SOTO1) was done by immunofluorescence on HEK293T transiently transfected with an LSEctin-expression vector.

Peptides based on the sequence of the LSEctin neck region (AAK-LMEQESALRELREEVTQGLA) and cytoplasmic tail (MDT-TRYSKWGGSSSEVPGGP WGRVWHWSRR) were synthesized using the multiple antigen peptide system. New Zealand white rabbits were immunized by subcutaneous injection of each individual peptide or the HIS-LSEctin protein (0.5 mg of a 1-mg/mL solution in phosphate-buffered saline) in complete Freud's adjuvant 1:1 on day 0 and in incomplete Freud's adjuvant 1:1 on days 21 and 42. Rabbits were bled on day 49, and serum was assayed for LSEctin recognition by Western blot. The resulting antisera (ADS-1 against the neck domain, ADS-3 against the cytoplasmic tail and ADS-4 against the HIS-LSEctin protein) were subsequently validated by Western blot on 10 µg of cell lysates, as described.²⁰ DC-SIGN was detected using a polyclonal antiserum against the neck region of the molecule.²² Isolation of detergent-insoluble and soluble MDDC cell membrane fractions was done by sucrose gradient ultracentrifugation as described.²³

Gene-expression profiling in dendritic cells

RNA from immature and LPS-mature MDDC from two independent donors, and monocyte-derived macrophages from three independent donors generated in the presence of either granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) or macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), were labeled, processed, and independently hybridized on Codelink human whole genome DNA chip of the Codelink microarray platform (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) containing 55 000 human gene targets. Scanned images were processed using the Codelink Expression Analysis Software. Raw data were normalized by the quantile method. Data corresponding to the experimental groups were analyzed by the Student *t* test. The raw *P* values obtained were adjusted using the control of the false discovery rate-based procedure and implemented in the multitest package within the Bioconductor set of routines (www.bioconductor.org).

Sugar-binding assays

For precipitation of Mannan-, N-acetyl-glucosamine-, and N-acetyl-galactosamine-binding proteins, K562 cells stably transfected with different LSECTin isoforms (3×10^6) were collected, washed with phosphate-buffered saline and 1 mM EDTA, and lysed. Then, each lysate was incubated with 50 μ L of Mannan-agarose (Sigma), N-acetyl-glucosamine-agarose (Sigma), or N-acetyl-galactosamine-agarose (Sigma) for 12 hours at 4°C. After extensive washing, bound proteins were eluted either by incubation with an excess of the sugars or boiling the agarose beads in 3 \times Laemmli's sample buffer. SDS-eluted material was resolved by SDS-PAGE and LSECTin detection accomplished with specific polyclonal antibodies.

Ebola glycoprotein (GP)1 and virus-binding assays

Ebola virus binding was determined using lentiviral particles pseudotyped with Ebola virus GP according to a transient transfection protocol previously described.²⁴ K562 transfectants were challenged with Ebola virus GP pseudotypes or controls: 25×10^4 cells were resuspended in 250 μ L complete medium and incubated overnight with 250 μ L of transfection supernatants. Cells were assayed for luciferase expression 48 hours postinfection. For inhibition experiments, cells were preincubated for 10 minutes at room temperature with the preimmune or ADS-1 polyclonal antibodies.

Ebola virus GP1 (envelope glycoprotein of the Zaire strain of Ebola virus, provided by Dr. Anthony Sanchez, CDC, Atlanta, GA) was fused with human IgG-Fc by subcloning into pEF-Fc (provided by Dr. J. M. Casanovas, CNB, CSIC, Madrid, Spain). The pSynp120IgG plasmid, which encodes strain JR-FL HIV gp120 fused to human IgG1Fc, was obtained from the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program (Germantown, MD). For binding experiments, envelope constructions were transfected into 293T cells and supernatants collected after 72 hours. MDDC were incubated for 30 minutes at room temperature with 1:10 dilution of the supernatants in phosphate-buffered saline, 2% FCS, 4 mM CaCl₂. Cells were then washed twice and incubated with a PE-conjugated goat antihuman IgG-Fc antibody (Immunotech, Marseille, France). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytometer using the Expo32 software.

LSECTin internalization assays

K562 cells were transiently transfected with LSECTin by Nucleofection (Amaxa). After 24 hours, cells were washed, resuspended in complete medium, and incubated with either SOTO1 (for LSECTin), P5D2 (for CD29), or TS1/18 (for CD18) antibodies for 30 minutes at 4°C to prevent internalization. After extensive washing, cells were placed at 37°C to allow internalization to occur, and aliquots were removed after 2, 5, and 15 minutes and immediately placed at 4°C. Then, cells were incubated with a 1:100 dilution of a FITC-labeled goat anti-mouse antibody (Serotec) to detect cell surface-bound antibodies. All incubations were done in the presence of 50 μ g/mL of human IgG to prevent binding through the Fc portion of the antibodies. In some cases, and to detect internalized antibodies, cells were fixed and permeabilized (CytoFIX/CytoPerm; BD Biosciences) before addition of the secondary antibody. Flow cytometry analysis was performed with an EPICS-CS (Coulter Cientifica, Madrid, Spain) using log amplifiers.

Results

LSECTin mRNA is found in monocyte-derived dendritic cells and is induced by IL-4

The LSECTin gene lies within the C-type lectin-encoding DC-SIGN/L-SIGN/CD23 gene cluster on chromosome 19p13.2.¹ Although reported to be exclusively expressed on liver and lymph node sinusoidal endothelial cells,⁹ its chromosomal location prompted us to determine whether LSECTin was found in myeloid cells. Microarray gene profiling experiments showed that LSECTin mRNA is expressed in immature and mature human MDDC (Figure 1A). MDDC contained significantly higher levels of LSECTin RNA than macrophages generated either in the presence of GM-CSF or M-CSF (Figure 1B). This set of data was verified by RT-PCR, because LSECTin mRNA was readily detected in MDDC but was

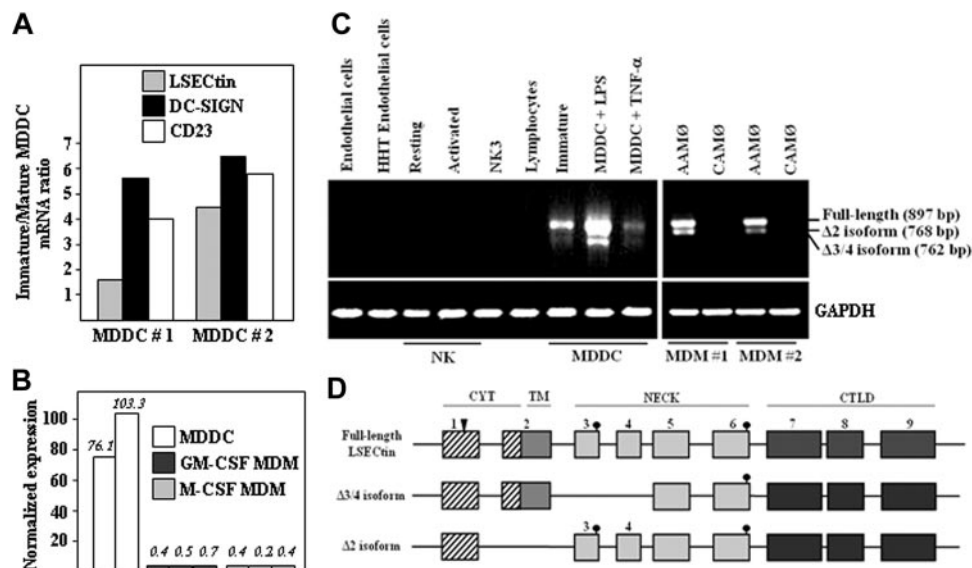


Figure 1. Expression of LSECTin mRNA in human MDDC. (A) Relative levels of LSECTin, DC-SIGN, and CD23 mRNA in immature and mature MDDC as determined by gene expression profiling using CodeLink Whole Genome Bioarrays. (B) Relative levels of LSECTin mRNA in immature MDDC from two independent donors and monocyte-derived macrophages generated in the presence of either GM-CSF or M-CSF from three independent donors, as determined by gene expression profiling using CodeLink Whole Genome Bioarrays. Values represent the intensity of expression normalized with the median of all the intensity values in the microarray. (C) Detection of LSECTin mRNA in hematopoietic cells, cell lines, and in vitro-generated monocyte-derived macrophages and dendritic cells. Total RNA was isolated from the indicated cells and cell lines and subjected to RT-PCR for amplification of the LSECTin coding region and GAPDH (as control). Analyzed RNA was obtained from endothelial cells from normal and HHT donors, resting and activated NK cells, the NK3 NK cell clone, peripheral blood T lymphocytes, MDM (interferon- γ -activated, CAM \emptyset ; IL-4-activated, AAM \emptyset), immature or mature (with either lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α) MDDC, and the THP-1 and K562 leukemic cell lines. (D) Schematic representation of the structure of LSECTin mRNA species amplified by RT-PCR from monocyte-derived dendritic cells. Boxes represent the individual exons, and the arrowhead marks the position of the initiation methionine. Dark circles indicate the potential N-glycosylation sites.

absent from peripheral blood lymphocytes, resting or activated NK cells, or CD34⁺-derived endothelial-like cells (Figure 1C).

LSECTin mRNA was seen in AAM \emptyset but absent in either naive or CAM \emptyset (Figure 1C). Sequencing of the two RT-PCR fragments routinely generated from MDDC and AAM \emptyset revealed the existence of three LSECTin mRNA species, which encode the prototypic isoform (full-length, 879 bp), an isoform lacking the transmembrane region ($\Delta 2$, 768 bp), and an isoform lacking the first two exons encoding the stalk region ($\Delta 3/4$, 762 bp) (Figure 1D). The full-length isoform was amplified from more than 20 unrelated MDDC donors, whereas the shorter isoforms were variably detected (data not shown). Therefore, LSECTin mRNA is differentially expressed in monocyte-derived macrophages and dendritic cells, with the latter containing three distinct mRNA species. Moreover, LSECTin expression can be detected in macrophages activated in the presence of IL-4 (AAM \emptyset).

The presence of LSECTin mRNA in AAM \emptyset , and the proximity of the LSECTin gene to that of DC-SIGN, whose expression is IL-4-dependent,^{4,10} led us to explore the cytokine responsiveness of the LSECTin gene. LSECTin mRNA was induced during GM-CSF + IL-4-promoted MDDC differentiation and was found to be responsive to the presence of IL-4 (Figure 2A). Besides, and in agreement with the microarray data, LSECTin mRNA was detected in MDDC matured with either lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α (Figure 2A). Similarly, IL-4 induced the appearance of LSECTin mRNA on proliferating or PMA-differentiated THP-1 cells, where the three LSECTin alternatively spliced isoforms were detected (Figure 2B). Because the combined addition of PMA and IL-4 promotes THP-1 cells to acquire a

dendritic cell-like phenotype,¹¹ these results are compatible with the presence of LSECTin in MDDC. More importantly, LSECTin mRNA was detected in ex vivo isolated peripheral blood myeloid dendritic cells (CD11c⁺ BDCA2-CD123⁻) (Figure 2C) as well as in myeloid and plasmacytoid thymic dendritic cells and thymic macrophages (Figure 2D). Sequencing of the amplified fragments confirmed the presence of the full-length and $\Delta 2$ isoforms in both thymic macrophages and myeloid dendritic cells, which were also seen in human liver RNA as control (Figure 2D). Altogether, these results indicate that LSECTin RNA is induced by IL-4 and is expressed by dendritic cells in vivo.

LSECTin protein expression in dendritic cells and macrophages

To confirm these results at the protein level, LSECTin-specific polyclonal antisera were raised and their specificity tested by enzyme-linked immunosorbent assay on purified recombinant HIS-LSECTin. Whereas an anti-HIS serum detected HIS-LSECTin and HIS- β -gal to a similar extent, ADS-1 (stalk region-specific) and ADS-4 antiserum (raised against the extracellular region of the molecule) exclusively reacted with HIS-LSECTin (Figure 3A). By contrast, and as expected, ADS-3 antiserum (specific for the LSECTin cytoplasmic tail) showed no reactivity against the HIS-LSECTin recombinant protein (Figure 3A). The LSECTin specificity of the ADS-1 and ADS-4 antisera was further demonstrated by Western blot after transient transfection of the full-length and the $\Delta 2$ isoforms in COS7 cells (Figure 3B).

The availability of the anti-LSECTin polyclonal antisera allowed us to address the presence of LSECTin protein in dendritic cells. Analysis of immature and mature MDDC demonstrated the presence of an ADS1-reactive protein band that comigrates with the LSECTin protein generated in COS-7 cells after transient transfection (Figure 3C). The specificity of the recognition was further demonstrated by the fact that the detected band was not observed in the presence of an excess of the immunizing peptide (Figure 3C, right panel). Moreover, and like DC-SIGN,²³ a significant percentage of LSECTin molecules were detected in lipid raft-enriched membrane fractions (Figure 3D), suggesting that LSECTin might also act as a signaling molecule. Therefore, LSECTin is expressed in monocyte-derived dendritic cells, where it might contribute to increase their pathogen-recognition capability.

Detection of LSECTin protein during MDDC differentiation and macrophage activation confirmed the mRNA data. The IL-4-dependent in vitro generation of AAM \emptyset resulted in up-regulation of LSECTin, which was not expressed by CAM \emptyset (Figure 4A). On the other hand, LSECTin was barely expressed in monocytes, increased after 48 hours in the presence of GM-CSF and IL-4, and reached maximal levels in immature MDDC (5-day treatment with GM-CSF + IL-4; Figure 4A). Analysis of MDDC from additional donors confirmed the presence of LSECTin protein in all cell extracts (data not shown). The presence of LSECTin was further evaluated by flow cytometry (Figure 4B) and confocal microscopy (Figure 4C), which revealed the presence of variable levels of LSECTin protein on the cell surface of monocyte-derived dendritic cells. Furthermore, flow cytometry revealed high levels of LSECTin on the cell surface of CD13⁺ CD14⁺ thymic macrophages, whereas weak levels were found on both thymic myeloid (CD13⁺ CD14⁻) and plasmacytoid (BDCA2⁺ CD123⁺) dendritic cells (Figure 4D). Therefore, LSECTin is expressed on the cell surface of in vitro differentiated (MDDC) and ex vivo isolated (thymic macrophages) myeloid cells.

Functional characterization of LSECTin

To evaluate the recognition capabilities of LSECTin, stable transfectants were generated in K562 cells (K562-LSECTin), where the

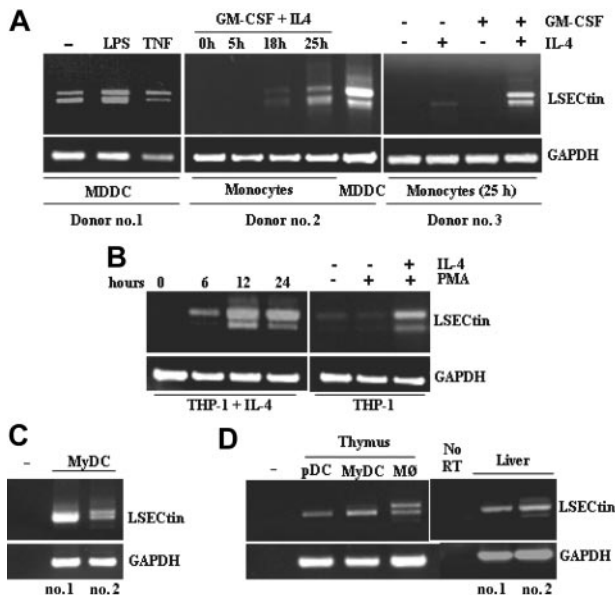


Figure 2. Cytokine-dependence of LSECTin mRNA levels in MDDC and detection of LSECTin mRNA in ex vivo peripheral blood and thymic dendritic cells. (A) Monocytes from three independent donors were treated for the indicated periods of time with either GM-CSF, IL-4, or both cytokines, or allowed to differentiate into MDDC and further matured with lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . After RNA extraction from the distinct cell types, the coding region of the LSECTin mRNA was amplified and the resulting fragments resolved by agarose gel electrophoresis. (B) THP-1 leukemic myeloid cells were treated for the indicated periods of time with IL-4 alone (left panel) or for 96 hours in the presence of IL-4 and the differentiation-inducing agent PMA (right panel). After RNA extraction from the distinct cell types, the coding region of the LSECTin mRNA was amplified and the resulting fragments resolved by agarose gel electrophoresis. (C) RNA was extracted from human myeloid peripheral blood dendritic cells from three independent donors and LSECTin mRNA detected by RT-PCR. (D) RNA was extracted from human myeloid and plasmacytoid thymic dendritic cells, thymic macrophages, or liver biopsies from three independent donors and LSECTin mRNA detected by RT-PCR. In all cases, GAPDH mRNA was amplified as a control.

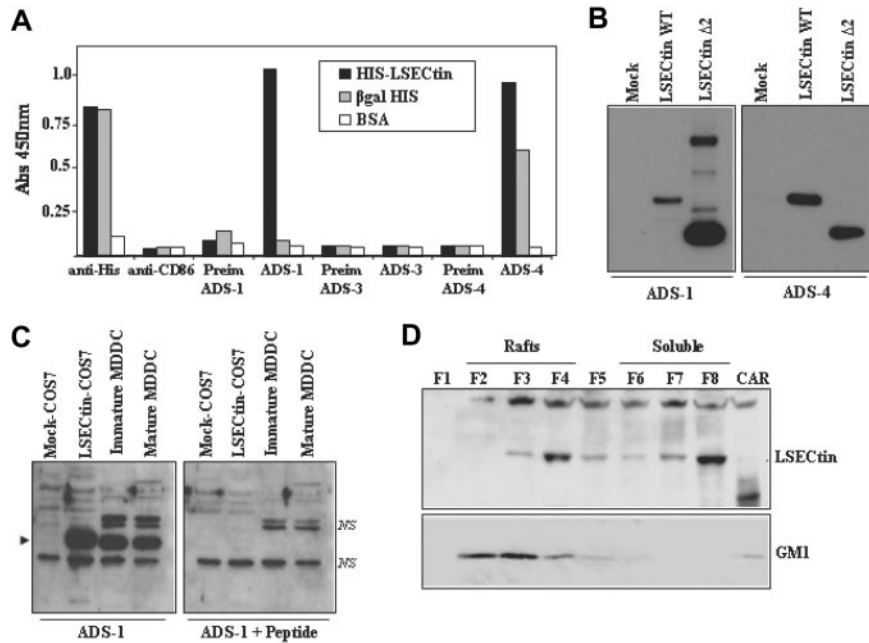


Figure 3. Expression of LSECtin in human MDDC. (A) Specificity of polyclonal antisera against LSECtin by enzyme-linked immunosorbent assay. High protein-binding 96-well plates were coated with either purified HIS-LSECtin, purified βgal-HIS, or BSA. After washing, wells were treated with either a monoclonal antibody against the HIS epitope (anti-His), a control monoclonal antibody (antiCD86), polyclonal antisera against LSECtin (ADS-1, ADS-3, ADS-4), or the corresponding preimmune sera. Bound antibodies were detected using HRP-conjugated goat antirabbit and goat antimouse polyclonal antisera. Quantification was done on a microplate enzyme-linked immunosorbent assay reader at 450 nm. (B) Specificity of polyclonal antisera against LSECtin by Western blot. Whole cell extracts were obtained from COS-7 cells transiently transfected with full-length LSECtin, the Δ2 LSECtin isoform (LSECtin Δ2), or mock-transfected cells (Mock). Ten micrograms of each whole cell extract was subjected to Western blot using the ADS-1 or ADS-4 polyclonal antisera specific for LSECtin. (C) Whole cell lysates were obtained from immature and mature MDDC, and 10 μg of each extract was subjected to Western blot using the ADS-1 anti-LSECtin polyclonal antiserum either alone (left panel) or in the presence of an excess of the immunizing peptide (right panel). Lysates from mock- and LSECtin-transfected COS-7 cells were included as controls. The position of the LSECtin protein is indicated by an arrowhead, and nonspecific bands are denoted as NS. (D) Immature MDDC were lysed in 1% Brij 98 lysis buffer at 37°C and fractionated by sucrose density gradient centrifugation. The low-density Brij 98-insoluble fractions 2-4 (lanes 2-4, Rafts) and the high-density Brij 98-soluble fractions 6-8 (lanes 6-8, soluble) were separated by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions, and the distribution of LSECtin was determined by immunoblotting. Cytoskeletal-associated Rafts (CAR), obtained by solubilization of the cell pellet with Brij98 + Octyl D-glucoside in lysis buffer, were analyzed in parallel (lane 9, CAR). Ten micrograms of each fraction was subjected to Western blot, and the distribution of LSECtin and ganglioside GM1 in the distinct fractions was determined by immunoblotting with the ADS-1 polyclonal antisera (LSECtin) or cholera toxin-HRP (GM1). The experiment was done on MDDC from two independent donors, and one of them is shown.

lectin was readily detectable on the cell surface either by flow cytometry (Figure 5A) or by immunoprecipitation of biotin-labeled cell surface proteins (Figure 5B) with polyclonal antisera (ADS-3, ADS-4) or the anti-LSECtin SOTO1 monoclonal antibody. Whereas K562-LSECtin and mock-transfected cells exhibited similar binding of VSV, expression of full-length LSECtin conferred K562 cells the ability to bind viral particles pseudotyped with Ebola or Marburg virus GP (Figure 5C). The viral binding to full-length LSECtin was almost completely abrogated in the presence of the ADS-1 polyclonal antiserum (Figure 5D), confirming the specificity of the interaction. In agreement with these results, K562-LSECtin cells specifically bound soluble Ebola virus glycoprotein GP1 (see subsequently). LSECtin also displayed Ebola GP1-binding ability when expressed on in vitro generated dendritic cells. Although HIV gp120 binding to MDDC was exclusively inhibited by anti-DC-SIGN antibodies, Ebola GP1 binding to MDDC was partially dependent on LSECtin (Figure 5E). In fact, complete abrogation of GP1 binding to MDDC was only observed in the presence of anti-LSECtin antiserum (ADS-1) and anti-DC-SIGN antibodies (MR1) (Figure 5E). Therefore, LSECtin displays pathogen-recognition capability when expressed on hematopoietic cells.

To compare the sugar-specificity of LSECtin with that of DC-SIGN, which acts as an Ebola virus attachment factor,²⁵ we performed sugar affinity experiments by incubation of extracts from DC-SIGN- and LSECtin-transfected K562 cells with Mannan-, N-acetyl-glucosamine-, and N-acetyl-galactosamine-agarose. Both the full-length and the Δ3/4 isoform were not retained by

Mannan-agarose, whereas DC-SIGN bound to this matrix (Figure 6A). However, both LSECtin isoforms were specifically retained by N-acetyl-glucosamine-agarose (Figure 6B) but not by N-acetyl-galactosamine-agarose (Figure 6C). LSECtin from MDDC exhibited the same sugar specificity, because it was retained by N-acetyl-glucosamine-agarose but not by Mannan-agarose (Figure 6D). Therefore, and in agreement with the results of pathogen-binding experiments, LSECtin exhibits a sugar-binding specificity that differs from that of the structurally related DC-SIGN lectin on both K562 transfectants and in vitro generated dendritic cells.

Finally, we evaluated the ability of LSECtin to act as an antigen-capturing receptor by performing internalization experiments with LSECtin-specific ligands. Engagement of LSECtin by SOTO1 led to a rapid loss of the molecule from the cell surface (50% reduction after 2 minutes, 80% after 15 minutes) but did not affect the cell surface levels of CD29 (Figure 7A). To find out whether antibody engagement triggered LSECtin internalization or shedding, a similar experiment was performed using permeabilized cells. No reduction in LSECtin levels was observed when cells were permeabilized before the addition of the secondary fluorescent antibody (Figure 7A), although to a lower extent, the addition of GP1 onto K562-LSECtin cells also resulted in down-regulation of LSECtin without affecting the expression of the CD29 integrin subunit (Figure 7B). Altogether, these results indicate that LSECtin is internalized on ligation on the cell surface and might thus participate in antigen binding and uptake at the early stages of an immune response.

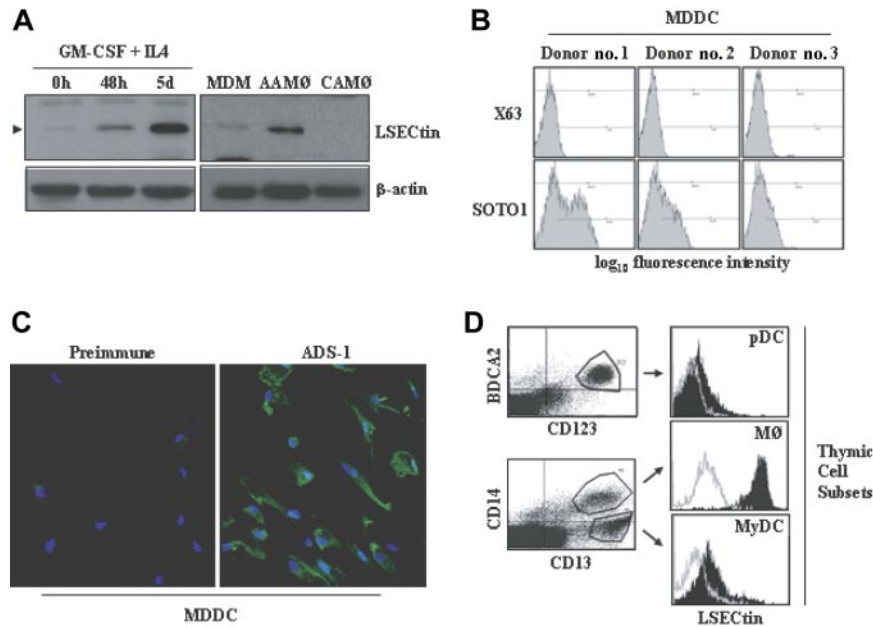


Figure 4. LSECtin expression on the cell surface of monocyte-derived dendritic cells and thymic-cell subsets. (A) Cell extracts were obtained from monocytes along the MDDC differentiation pathway by treating them with GM-CSF plus IL-4 for the indicated periods of time. In parallel, extracts were obtained from GM-CSF-generated macrophages after a 48-hour treatment with medium (MDM), IL-4 (AAM0), or interferon- γ (CAM0). In all cases, 10 μ g of each lysate was subjected to Western blot for detection of LSECtin with the ADS-1 polyclonal antiserum and β -actin expression determined in parallel for loading control purpose. (B) Cell surface expression levels of LSECtin in monocyte-derived dendritic cells from three independent donors as determined with the anti-LSECtin SOTO1 monoclonal antibody. The supernatant from the P3 \times 63 myeloma was used as negative control (X63). (C) MDDC were allowed to differentiate on glass coverslips, fixed (paraformaldehyde 2%), washed, and incubated with either a polyclonal antiserum against LSECtin (ADS-1) or preimmune serum. After washing, cells were incubated with a 1:500 dilution of Alexa 488-labeled goat anti-rabbit IgG (F(ab')₂ antiserum). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindol dichlorhidrato (DAPI). Coverslips were mounted in Dako Cytomation fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) and representative fields photographed through an HCX PL APO lens (63.0 \times 1.40 oil objective), with a 1.400000 numerical aperture on a TCS-SP2-ADBS confocal laser LEICA scanning system (LEICA MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Germany). (D) Expression of LSECtin in human thymic cell populations. Human thymic cell preparations were depleted of thymocytes by centrifugation on Ficoll after rosetting with sheep erythrocytes. The resulting population was then stained with either PE-labeled anti-CD123 and FITC-labeled BDCA2 or with FITC-labeled anti-CD14 and PE-labeled anti-CD13 antibodies. The BDCA2⁺ CD123⁺ (plasmacytoid DC [pDC]), CD14⁺ CD13⁺ (macrophages [M0]), and CD14⁻ CD13⁺ (myeloid DC [MyDC]) subsets (left panels) were simultaneously stained with the anti-LSECtin SOTO1 monoclonal antibody followed by incubation with an APC-labeled goat anti-mouse antiserum (right panels).

Ligand-induced endocytosis is a property shared by lectins involved in antigen capture and presentation and is dependent on the presence of internalization motifs in the cytoplasmic tail.² To determine the molecular basis for the antibody-induced LSECtin internalization, two potential internalization motifs similar to those present in other lectins (Y⁶SKW and E¹⁴E¹⁵) were mutated and assayed for internalization capability. Mutation of either Y⁶ (to F⁶) or E¹⁴E¹⁵ (to A¹⁴A¹⁵) significantly reduced the ligand-induced internalization of LSECtin (Figure 7C). Although mutation of Y⁶ exhibited a stronger effect at early time points (2 minutes), disruption of both motifs (LSECtin DM) reduced internalization to a higher extent than each individual mutations (after 5 or 15 minutes) (Figure 7C). By contrast, mutation of the three tryptophan residues within the cytoplasmic tail (W²¹GRW²⁴VHW,²⁷ LSECtin 3W/3A) had no effect (Figure 7C). Therefore, the ability of LSECtin to be internalized on ligand binding is dependent on the integrity of both Y⁶SKW and E¹⁴E¹⁵ motifs in the cytoplasmic tail. LSECtin was found to be internalized at a similar rate in MDDC, because only 20% of LSECtin molecules remain on the cell membrane 15 minutes after antibody engagement (Figure 7D). Therefore, LSECtin is internalized after engagement in both transfectants and monocyte-derived dendritic cells, suggesting its involvement in antigen capture and internalization by myeloid cells.

Discussion

The gene cluster in chromosome 19p13.2 includes the C-type lectin-encoding genes CD23, DC-SIGN (CD209), LSECtin, and

DC-SIGNR, with the first three of them arranged adjacent to one another and in the same orientation. In the present report, we demonstrate that LSECtin, originally defined as a liver and lymph node sinusoidal-specific lectin,⁹ can be induced by IL-4 on human peripheral blood monocytes and is expressed by in vitro generated dendritic cells and alternatively activated macrophages as well as by ex vivo thymic myeloid cells. The IL-4 dependence of LSECtin expression resembles the cytokine responsiveness of the DC-SIGN and CD23 genes, whose expression is either induced or up-regulated by IL-4,^{10,26} and suggests a common mechanism for their coordinated up-regulation in IL-4-treated monocytes. Moreover, and like DC-SIGN and CD23, LSECtin is internalized on ligand binding. Therefore, DC-SIGN, CD23, and LSECtin comprise a cluster of structurally related lectin genes expressed on myeloid cells regulated by IL-4 and involved in antigen capture. At present, we have no explanation for the discrepancy between the previously reported lack of LSECtin mRNA detection in MDDC⁹ and the data presented in this article, especially considering that MDDC were generated following an identical protocol. LSECtin expression in MDDC is consistent with its induction in alternatively activated macrophages, which share a number of membrane markers with MDDC,¹¹ and with the presence of LSECtin mRNA in peripheral blood and thymic dendritic cells. Therefore, it can be concluded that LSECtin exhibits a wider cell type distribution than DC-SIGN and CD23 being expressed in both hematopoietic and nonhematopoietic cell lineages.

Like in the case of other C-type lectins,²⁷ three distinct alternatively spliced isoforms can be predicted for LSECtin based on the sequences of the amplified mRNAs. The LSECtin gene gives

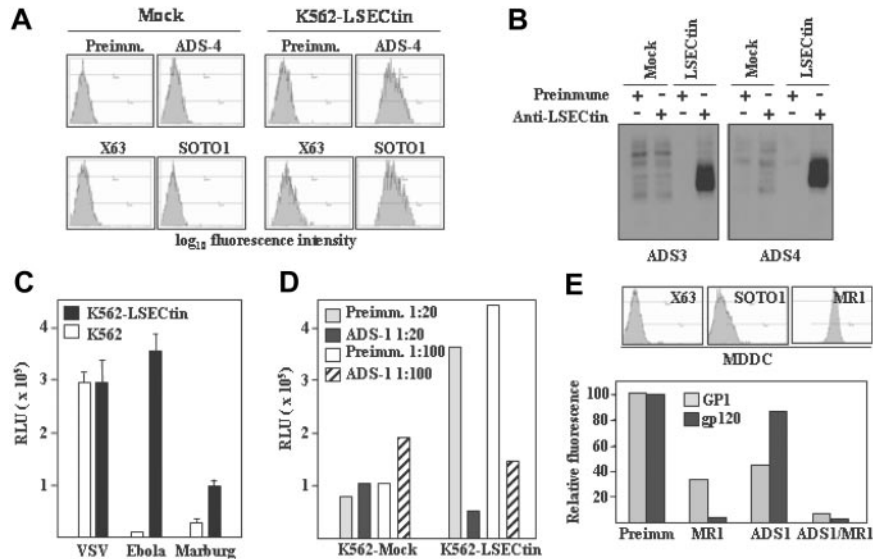


Figure 5. Pathogen-recognition ability of LSECtin. (A) Generation of LSECtin stable transfectants. K562 cells were transfected with an empty vector (Mock) or with an LSECtin expression vector (LSECtin) and grown in G418-containing selective medium. LSECtin expression was determined by indirect immunofluorescence with a polyclonal antiserum against LSECtin (ADS-4) or the SOTO1 anti-LSECtin monoclonal antibody. Preimmune polyclonal antiserum (Preimm.) and the supernatant from the P3 × 63 myeloma (X63) were used as controls. (B) Mock-transfected K562 cells (Mock) or K562-LSECtin cells stably transfected with full-length LSECtin (LSECtin) were surface-labeled with a water-soluble and membrane-impermeable biotin derivative (EZ-linked Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce, Rockford, IL), washed, lysed, and immunoprecipitated with polyclonal antisera against LSECtin (left panel, ADS-3; right panel, ADS-4) or preimmune serum. Precipitated material was resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and subjected to Western blot with HRP-streptavidin. (C) Binding of Ebola and Marburg pseudovirus to LSECtin-transfected cells. Mock-transfected and K562-LSECtin transfectants were challenged with vesicular stomatitis virus (VSV), Marburg or Ebola virus GP pseudotypes, and cells were assayed for luciferase expression 48 hours postinfection. (D) Inhibitory effect of the ADS-1 anti-LSECtin polyclonal antiserum on the Ebola pseudovirus binding to LSECtin. The experiment was performed like in D, but cells were preincubated for 10 minutes at room temperature with the preimmune or ADS-1 polyclonal antibodies before viral addition. (E) Binding of Ebola virus GP1 and HIV gp120 to MDDC. Cells were incubated with the recombinant proteins either in the absence or in the presence of antibodies against DC-SIGN (MR1), LSECtin (ADS-1), or both and binding measured by flow cytometry. Protein binding is measured as relative fluorescence, which indicates the binding observed in each experimental condition relative to the binding detected in the presence of preimmune antiserum (considered as 100). The level of expression of LSECtin and DC-SIGN in the assayed MDDC is illustrated in the upper panel.

rise to both membrane-bound and a transmembrane-lacking potentially soluble isoform ($\Delta 2$ isoform). The relative levels of the distinct LSECtin mRNA species appear to be dependent on the cell type: thymic macrophages exhibit equivalent amounts of LSECtin mRNA coding for full-length and truncated ($\Delta 2$ and $\Delta 3/4$) molecules, whereas thymic dendritic cells almost exclusively contain LSECtin mRNA for the shorter versions of the molecule. Interestingly, and as in the case of DC-SIGN,²⁷ a significant percentage of LSECtin mRNA species coding for a transmembrane domain-lacking potentially soluble isoform (LSECtin $\Delta 2$) have been detected not only in dendritic cells (generated in vitro and isolated ex vivo), but also in alternatively activated macrophages and even

in the THP-1 cell line. In fact, and unlike full-length LSECtin, the LSECtin $\Delta 2$ isoform can be detected in the supernatant of transfected cells (data not shown), suggesting that it is stable in the extracellular milieu and that it might function as an opsonizing agent. In this regard, a large number of cell surface lectins and lectin-like molecules exhibit potentially soluble isoforms,²⁸ and several soluble lectins display pathogen-recognition capability.²⁹ The soluble form of CD23 is found in serum and is generated by endogenous or exogenous proteases that cleave CD23 from the cell surface²⁶ and has been described as regulating IgE synthesis.³⁰ The availability of the reagents described in the present article will allow us to determine whether LSECtin can be

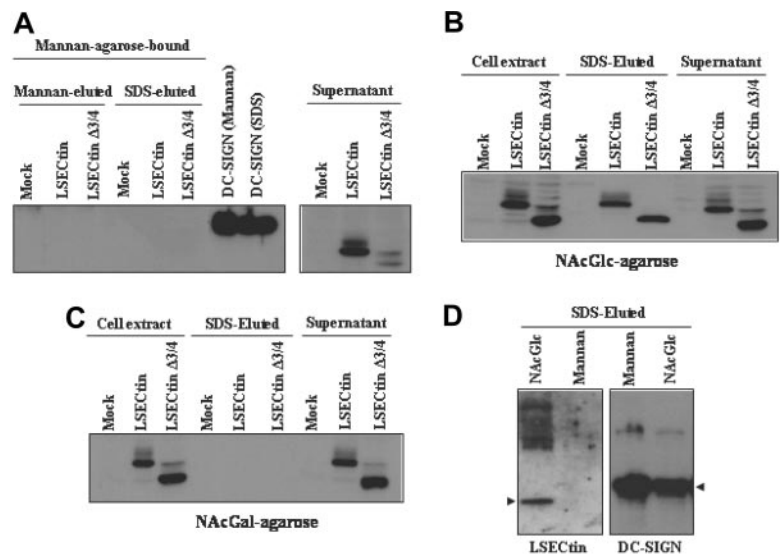


Figure 6. Binding specificity of LSECtin in dendritic cells and transfectants. Whole cell lysates from K562 cells stably transfected with full-length LSECtin (LSECtin), the $\Delta 3/4$ isoform (LSECtin $\Delta 3/4$), DC-SIGN, or mock-transfected (Mock) were loaded onto Mannan- (A), N-acetyl-glucosamine- (NAcGlc, B), or N-acetyl-galactosamine (NAcGal)-agarose (C) and retained proteins eluted with SDS sample buffer (SDS-eluted) and analyzed by Western blot using the ADS-1 anti-LSECtin polyclonal antiserum. As a control, aliquots from nonretained material (supernatant) were analyzed in parallel. (D) Whole cell lysates from monocyte-derived dendritic cells were loaded onto Mannan- or N-acetyl-glucosamine- (NAcGlc)-agarose and retained proteins eluted with SDS sample buffer (SDS-eluted) and analyzed by Western blot using polyclonal antisera against LSECtin (ADS-1) or DC-SIGN (DSG1).

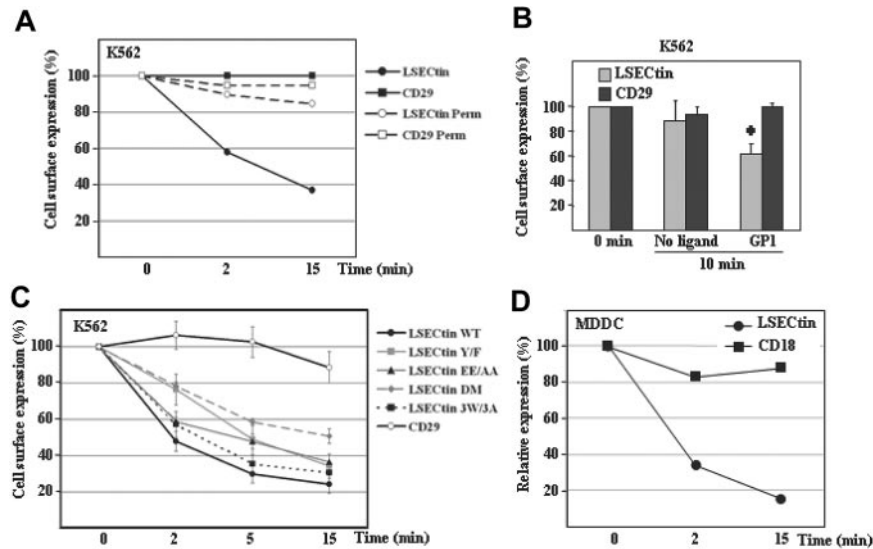


Figure 7. Ligand-induced internalization of LSECtin in transfectants and monocyte-derived dendritic cells. (A) Monoclonal antibody-induced internalization of LSECtin in K562 transfectants. K562-LSECtin cells were incubated with either the SOTO1 (antiLSECtin) or the P5D2 (antiCD29) antibodies for 30 minutes at 4°C. After extensive washing in cold phosphate-buffered saline, cells were transferred to 37°C for the indicated time points, fixed, and the presence of cell surface-bound antibodies detected with FITC-labeled F(ab')₂ anti-mouse IgG. Where indicated, cells were fixed and permeabilized before addition of the fluorescent secondary antibody (Perm). Values represent the fluorescence intensity of the cells at the distinct time points relative to the fluorescence intensity of control cells maintained at 4°C. One representative experiment of two is shown. (B) Ebola GP1-induced internalization of LSECtin. K562-LSECtin cells were either untreated or incubated with Ebola virus GP1-Fc (GP1) for 10 minutes at 37°C, transferred to 4°C, and the expression of LSECtin or the CD29 integrin (negative control) determined by indirect immunofluorescence with SOTO1 or P5D2 monoclonal antibodies and FITC-labeled F(ab')₂ anti-mouse IgG. Values represent the fluorescence intensity of the cells at the distinct time points relative to the fluorescence intensity of control cells maintained at 4°C. Mean ± standard deviation of three independent experiments is shown (**P* = 0.001). (C) Cytoplasmic motifs involved in LSECtin ligand-induced internalization. K562 cells were transiently transfected with expression vectors for WT LSECtin or LSECtin mutated at Y⁶ (LSECtin Y/F), E¹⁴E¹⁵ (LSECtin EE/AA), W²¹GRW²⁴VHW²⁷ (LSECtin 3W/3A), or at both Y⁶ and E¹⁴E¹⁵ (LSECtin DM). Twenty-four hours later, cells were washed and incubated with the SOTO1 (anti-LSECtin) or the P5D2 (anti-CD29) antibodies for 30 minutes at 4°C. After extensive washing in cold phosphate-buffered saline, cells were transferred to 37°C for the indicated time points (2, 5, 15 minutes), placed on ice, and the presence of cell surface-bound antibodies detected with FITC-labeled F(ab')₂ anti-mouse IgG. Values represent the fluorescence intensity of the cells at the distinct time points relative to the fluorescence intensity of control cells maintained at 4°C. Shown are the mean and standard deviation of three independent experiments. (D) Monoclonal antibody-induced internalization of LSECtin in MDDC. MDDC were incubated with either the SOTO1 (anti-LSECtin) or the TS1/18 (anti-CD18) antibodies for 30 minutes at 4°C. After extensive washing in cold phosphate-buffered saline, cells were transferred to 37°C for the indicated time points and immediately transferred to 4°C. The presence of cell surface-bound antibodies was detected with FITC-labeled F(ab')₂ anti-mouse IgG. Relative expression of each protein was measured by multiplying the percentage of marker-positive cells by their mean fluorescence intensity and is referred to the value obtained for control cells maintained at 4°C (considered as 100). One representative experiment of two is shown.

detected in serum and whether soluble LSECtin might also influence the IgE network.

Evaluation of the sugar specificity in precipitation assays has revealed that LSECtin interacts with N-acetyl-glucosamine (NAcGlc) but is not retained by N-acetyl-galactosamine (NAcGal) or Mannan. Although previously described to interact with Mannan,⁹ our results are in agreement with the lack of Mannan-binding reported by Gramberg et al,¹⁹ despite the presence of the EPN motif in calcium-binding site 2 that mediates Mannose/NAcGlc binding in other C-type lectins.³¹ Thus, LSECtin specificity is distinct from CD23, which binds better to Gal-NAcGal-containing structures than to Gal-NAcGlc-structures,²⁶ and would also differ from DC-SIGN in their ability to be retained by Mannose-containing matrices (Figure 6). Therefore, available data suggest that the three lectins encoded within the 19p13.2 gene cluster are not functionally redundant in terms of sugar-binding specificity. The different carbohydrate specificity of DC-SIGN and LSECtin is further suggested by the distinct aggregation behavior of their corresponding transfectants in K562 cells.³²

The nonredundant sugar specificity of the three lectins would also imply that DC-SIGN, CD23, and LSECtin differ in their pathogen-recognition capabilities. In fact, our results and those of others¹⁹ indicate that this is indeed the case, because LSECtin does not mediate the binding and uptake of DC-SIGN-interacting pathogens such as HIV, hepatitis C virus,¹⁹ *Leishmania*, *Candida*, or *Aspergillus* (data not shown). However, although the failure of K562-LSECtin to capture these pathogens is in agreement with the inability of Mannan-agarose matrix to retain LSECtin,

these results should be interpreted with caution, because DC-SIGN-dependent pathogen-recognition activities are greatly dependent on the cell surface level of expression.²² Therefore, an extensive analysis of the sugar-binding specificity of LSECtin should be performed before ruling out its ability to interact with DC-SIGN-interacting pathogens.

Several distinct motifs (tyrosine-based, dileucine-based, glutamic-rich sequences) have been identified as responsible for the internalization of dendritic cell lectins involved in antigen capture for subsequent presentation.³³ In the case of LSECtin, its ligand-induced internalization ability is dependent on two internalization motifs (Y⁶SKW and E¹⁴E¹⁵) within the cytoplasmic tail of the molecule, which is devoid of a dileucine motif. Analysis of the LSECtin cytoplasmic tail reveals the presence of a tryptophan-rich sequence that conforms to the consensus WXYWXYWXY, where X is a small amino acid and Y is a positively charged residue. Although this sequence resembles motifs found in cytoskeletal and extracellular proteins, its disruption had no effect on LSECtin internalization, which leads us to hypothesize its involvement in signal transduction. The internalization ability of LSECtin fits well with the effector functions of macrophages and dendritic and sinusoidal cells, which constitutively capture extracellular material either for scavenging purposes or for antigen processing and presentation. Along this line, the presence of LSECtin in thymic macrophages and dendritic cells, which are involved in central tolerance induction,³⁴ is suggestive of a role for LSECtin in antigen presentation and tolerance. On the other hand, the expression of LSECtin in MDDC indicates that the molecule could be a potential

target molecule in vaccination strategies, a capacity already demonstrated for DEC-205 and DC-SIGN.^{35,36} If so, determination of the LSECtin specificity might be helpful to understand whether the molecule participates in triggering immune responses (through recognition of PAMPs) or preferentially acts as a tolerance-inducing receptor (through capture of self-antigens).

Acknowledgments

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (grants SAF2005-0021, AGL2004-02148-ALI, and GEN2003-20649-C06-01/NAC) and Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España (FIPSE 36422/03) to ALC. A.D.S. was supported by a FPI predoctoral grant (BES2004-4405) from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

References

- Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol*. 2000;165:2937-2942.
- Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:539-546.
- Schjetne KW, Thompson KM, Aarvak T, Fleckenstein B, Sollid LM, Bogen B. A mouse C kappa-specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation. *Int Immunol*. 2002;14:1423-1430.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000;100:575-585.
- Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*. 2001;294:2163-2166.
- Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:77-84.
- van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:697-709.
- Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, et al. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2001;193:671-678.
- Liu W, Tang L, Zhang G, et al. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem*. 2004;279:18748-18758.
- Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol*. 2002;168:2634-2643.
- Puig-Kroger A, Serrano-Gomez D, Caparros E, et al. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem*. 2004;279:25680-25688.
- Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, et al. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol*. 2002;71:445-457.
- Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood*. 2002;100:1780-1786.
- van Lent PL, Figdor CG, Barrera P, et al. Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells. *Arthritis Rheum*. 2003;48:360-369.
- Engering A, van Vliet SJ, Hebeda K, et al. Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes. *Am J Pathol*. 2004;164:1587-1595.
- Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol*. 2005;175:4265-4273.
- Mukhtar M, Harley S, Chen P, et al. Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology*. 2002;297:78-88.
- Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, et al. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2670-2675.
- Gramberg T, Hofmann H, Moller P, et al. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology*. 2005;340:224-236.
- Dominguez-Soto A, Puig-Kroger A, Vega MA, Corbi AL. PU.1 regulates the tissue-specific expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem*. 2005;280:33123-33131.
- de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML. Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 2002;99:2948-2956.
- Serrano-Gomez D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol*. 2004;173:5635-5643.
- Caparros E, Munoz P, Sierra-Filardi E, et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 2006;107:3950-3958.
- Wool-Lewis RJ, Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol*. 1998;72:3155-3160.
- Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol*. 2002;76:6841-6844.
- Kijimoto-Ochiai S. CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:648-664.
- Mummidi S, Catano G, Lam L, et al. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem*. 2001;276:33196-33212.
- Cambi A, Koopman M, Figdor CG. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol*. 2005;7:481-488.
- Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol*. 2005;42:145-152.
- Shakib F, Schulz O, Sewell H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunol Today*. 1998;19:313-316.
- Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature*. 1992;360:183-186.
- de la Rosa G, Yanez-Mo M, Samaneigo R, et al. Regulated recruitment of DC-SIGN to cell-cell contact regions during zymosan-induced human dendritic cell aggregation. *J Leukoc Biol*. 2005;77:699-709.
- Mahnke K, Knop J, Enk AH. Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat.' *Trends Immunol*. 2003;24:646-651.
- Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17:304-312.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002;196:1627-1638.
- Tacke PJ, de Vries IJ, Gijzen K, et al. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*. 2005;106:1278-1285.

Authorship

Contribution: A.D.S. designed the research and performed the experiments; L.A.F., E.G.M., L.M.P., and P.M. performed the research (lipid raft preparation, thymic cell separation, Ebola-binding assays); M.L.T., M.C., M.Z., R.D., and F.B. provided reagents and supervised individual experiments; and A.L.C. supervised research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Angel L. Corbí, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Velázquez 144, 28 006 Madrid, Spain; e-mail: acorbi@cib.csic.es.

2.- LSEctin está presente en células mieloides hepáticas y su expresión está regulada por PU.1.

LSEctin ("Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin", CLEC4G) es una lectina tipo C codificada en el cromosoma 19p13.2, junto a DC-SIGNR/DC-SIGN/CD23. LSEctin reconoce el virus Ébola y SARS, y su expresión puede ser inducida por IL-4 en monocitos y macrófagos. Aunque se describió como una molécula específica de células endoteliales sinusoidales de nódulo linfático e hígado, el análisis inmunohistoquímico de tejido hepático humano ha revelado que LSEctin está presente en células de Kupffer que expresan el marcador mieloides CD68. La expresión de LSEctin en células de origen mieloides viene apoyada por los resultados del análisis de la región reguladora proximal del gen de LSEctin humano, que contiene una región rica en elementos reconocidos por PU.1 en torno a la posición -70 y cuya actividad es máxima en células mieloides LSEctin⁺. PU.1 transactiva la región reguladora de LSEctin en colaboración con otros factores de transcripción característicos del linaje hematopoyético como RUNX3, y se une constitutivamente al promotor proximal de LSEctin en células dendríticas derivadas de monocitos según experimentos de inmunoprecipitación de cromatina. Además, la disminución de los niveles de PU.1 conlleva una reducción de los niveles de RNA mensajero para LSEctin en células THP-1 y células dendríticas derivadas de monocitos, lo que apoya la implicación de PU.1 en la expresión de LSEctin en células mieloides. Por tanto, LSEctin se expresa en células mieloides y su expresión depende del factor de transcripción PU.1.

LSEctin is expressed in Kupffer cells and its expression is regulated by PU.1.

Running title: Regulation of LSEctin expression

**Ángeles Domínguez-Soto ¹, Laura Aragoneses-Fenoll ¹, María Teresa Corcuera ²,
Fernando Gómez-Aguado ², Carmelo García-Monzón ³, Matilde Bustos ⁴, and
Angel L. Corbí¹**

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain.

² Hospital Carlos III, Madrid, Spain.

³ Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁴ CIMA, Navarra, Spain

Authors' contributions: ADS and LAF, designed research and performed most experiments; and MB performed research (PCR on mouse and liver cells); MTC, FGA and CGM performed immunohistochemistry experiments; ALC, supervised research and wrote the paper.

Grant support.- Supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (Grants SAF2005-0021 and GEN2003-20649-C06-01/NAC) and Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (Spanish Network for the Research in Infectious Diseases, REIPI RD06/0008). ADS was supported by a FPI predoctoral grant (BES2004-4405) from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

Corresponding author: Dr. Angel L. Corbí, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Velázquez 144, 28006 Madrid, SPAIN.

Phone: 34-1-5644562, ext. 4312; FAX: 34-1-5627518; E-mail: acorbi@cib.csic.es

ABSTRACT

Human LSEctin (Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin, CLEC4G) is a C-type lectin encoded within the L-SIGN/DC-SIGN/CD23 gene cluster. LSEctin acts as a pathogen-attachment factor for Ebola and SARS virus, and its expression can be induced by IL-4 on monocytes and macrophages. Although reported as a liver and lymph node sinusoidal endothelial cell-specific molecule, LSEctin could be detected in the MUTZ-3 dendritic-like cell line at the mRNA and protein level, and immunohistochemistry analysis on human liver revealed its presence in Kupffer cells co-expressing the myeloid marker CD68. The expression of LSEctin in myeloid cells was further corroborated through the analysis of the proximal regulatory region of the human LSEctin gene, which contains a highly conserved PU.1-binding site at position -70 and whose activity was maximal in LSEctin+ myeloid cells. PU.1 transactivated the LSEctin regulatory region in collaboration with other hematopoietic-restricted transcription factors (Myb, RUNX3), and was found to be constitutively bound to the LSEctin proximal promoter in human monocyte-derived dendritic cells by chromatin immunoprecipitation analysis. Moreover, knockdown of PU.1 through the use of siRNA led to a decrease in LSEctin mRNA levels in both THP-1 myeloid cells and in monocyte-derived dendritic cells, thus confirming the involvement of PU.1 in the myeloid expression of the lectin. Therefore, LSEctin is expressed by myeloid cells and its expression is dependent on the PU.1 transcription factor.

INTRODUCTION

The gene cluster at chromosome 19p13.2 includes the genes encoding for the type II C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN, CD23 and LSECtin (1-4), all of which contain a single carbohydrate-recognition domain (CRD) followed by a stalk region, a transmembrane region and cytoplasmic domain containing various internalization motifs. DC-SIGN, L-SIGN and LSECtin function as endocytic receptors and mediate binding and internalization of clinically relevant viral, bacterial and fungal pathogens (5, 6). CD23 is expressed on myeloid and activated B lymphocytes, where it functions as a low affinity receptor for IgE and plays a role in limiting the extent of IgE-mediated pathologies (7, 8). DC-SIGN is expressed on myeloid dendritic cells (1, 9), alternatively activated *in vitro* macrophages (10), interstitial dendritic cells (11), a subset of CD14⁺ peripheral blood dendritic cells (12), and macrophages from various tissues (13-15), whereas L-SIGN is exclusively expressed on endothelial cells of liver, lymph nodes, and placenta (16, 17), but not on myeloid cells. Although reported to be exclusively expressed on liver and lymph node sinusoidal endothelial cells (4), LSECtin has been later found to be expressed on *ex vivo* isolated human peripheral blood and thymic dendritic cells, as well as in dendritic cells and alternatively activated macrophages generated *in vitro*, where its expression is IL-4-dependent (5). The carbohydrate specificity of LSECtin has been recently determined (18), and its ability to recognize glycoproteins with truncated complex and hybrid N-linked glycans terminating in GlcNAcMan is not shared with DC-SIGN and suggests a scavenging function.

Together with sinusoidal endothelial cells and Ito cells, Kupffer cells are an integral part of the hepatic sinusoid, as they account for 15% of all liver cells and more than 50% of resident macrophages in the whole body (19). Kupffer cells exhibit a strong endocytic activity, and actively remove plasma proteins and potentially hazardous microorganisms from the blood to maintain tissue homeostasis (20), a function dependent on the large array of scavenger receptors exposed on their cell surface (21). In fact, Kupffer cells have been long known to mediate the removal of particulate material from the portal circulation (22). The presence of LSECtin in myeloid cell subsets (5) prompted us to clarify its cell distribution in liver cells. We now report that LSECtin is expressed in human Kupffer cells, where its expression correlates with the presence of the myeloid-

restricted PU.1 transcription factor. Moreover, PU.1 binds *in vivo* to the human LSECtin proximal promoter, where it potentiates its myeloid-restricted activity, and reduction of PU.1 protein levels leads to a diminished expression of the LSECtin mRNA. Therefore, PU.1 contributes to the myeloid expression of LSECtin, which constitutes a novel addition to the arsenal of scavenging molecules expressed by liver Kupffer cells.

METHODS

Cell culture, transfection and site-directed mutagenesis.- Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). To generate monocyte-derived dendritic cells (MDDC), CD14⁺ cells (>95% monocytes) were cultured at 0.5×10^6 cells/ml in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES and 2 mM glutamine (complete medium), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and containing 1000 U/ml GM-CSF and 1000 U/ml IL-4 (Immunotools, Friesoythe, Germany) for 5-7 days, with cytokine addition every second day. The K562 (chronic myelogenous leukemia) and THP-1 (monocytic leukemia) cell lines were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES and 2 mM glutamine (complete medium), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. MUTZ-3 cells (23-25) were maintained in complete medium supplemented with GM-CSF (10 ng/ml) and their dendritic differentiation induced in the presence of 1000 U/ml IL-4 for 5 days. NIH-3T3 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS.

Transfection of NIH-3T3, Jurkat and K562 cells was performed with Superfect (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Transfections were carried in 24-well plates out using 1 µg of firefly luciferase-based reporter plasmid and 100-400 ng of eukaryotic expression plasmid DNA on 8×10^5 (K562) or 4×10^4 (NIH-3T3) cells. THP-1 cells were transfected using DEAE-Dextran following standard procedures (26). In reporter gene experiments, the amount of DNA in each transfection was normalized by using the corresponding insertless expression vector (CMV-0) as carrier. Each transfection experiment was performed at least three times with different DNA preparations. Transfection efficiencies were normalized by cotransfection with the pCMV-βgal plasmid, and β-galactosidase levels determined using the Galacto-Light kit (Tropix, Bedford, Massachusetts). The LSEctin-based reporter gene constructs pCLEC4G-591, pCLEC4G-296 and pCLEC4G-247 were generated by PCR amplification of the -591/+16, -296/+16 and -247/+16 fragments of the LSEctin promoter with oligonucleotides 5'CCAAGCTTGGAAAATAAGGCTTCT

AGAAGC-3', 5'-CCAAGCTTGGTGACTAAGCTCCAAAGAGAAG-3' and 5'-GGGGTACCCGATGCAGGCACCCAGTCC-3', and the resulting fragments cloned into HindIII and KpnI-digested pXP2 plasmid (27). Positions within the LSECtin regulatory regions were numbered from the predicted transcriptional start site. The PU.1 expression plasmids for human PU.1, RUNX3 and Myb have been previously described (26).

THP-1 cells or MDDC (2×10^6 cells) were nucleofected with 3 μ g of siRNA for PU.1 (*sc-36330* PU.1 siRNA gene silencer, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz) or a control siRNA (*sc-37007* Control siRNA-A, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz) using the Cell Line Nucleofector kit V for THP-1 and Human Dendritic Cell Nucleofector kit for MDDC (Amaxa, Cologne, Germany). After nucleofection, cells were kept in culture for 24 hours, and one-fifth of the cells were lysed and subjected to Western blot for PU.1 detection. Total RNA was isolated from the rest of nucleofected cells and subjected to real time-PCR for detection of LSECtin and GAPDH mRNA. Site-directed mutagenesis was performed on the LSECtin promoter construct pCLEC4G-296Luc using the QuikChange System (Stratagene, La Jolla, CA). For mutation of the PU.1-99 and PU.1-66 elements, the oligonucleotides PU.1-99mutS (5'-CCTG TGATTGGTCCATGGGTCGACGTTGCCAGGAATTAAGG-3'), PU.1-99mutAS (5'-CCTTAATTCCTGGCAACGTCGACCCATGGACCAATCACAGG-3'), PU.1-66mutS (5'-GGCCAAGAAAATGGGGTCGACCGACGGGAGTGC GTAGGTCCAGTG -3'), PU.1-66mutAS (5'-CACTGGACCTACGCACTCCCGTCGGTCGACCCCATTTTC TTGGCC -3') were used, and the resulting plasmids were termed pCLEC4G-296-99MUT and pCLEC4G-296-66MUT. All DNA constructs and mutations were confirmed by DNA sequencing.

Immunohistochemistry.- Immunostaining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections from normal human liver and lymph node showing hiperplasia. Paraffin sections were cut at 4 μ m thickness and placed onto positively charged capillary gap microscope slides. Deparaffinization in xylene and hydration through graded alcohols was followed by heat-induced epitope retrieval. The slides were pressure-cooked for 3 min in 10 mM buffer citrate, pH 6.0 and then left in the buffer for 20 min at room temperature. Preparations were incubated with the distinct antibodies

for 25 min at room temperature. As secondary antibody, a biotinylated goat anti-rabbit polyclonal (ChemMate detection Kit, DakoCytomation) was applied, followed by HRP-conjugated streptavidin. Finally the slides were developed in DAB (ChemMate detection Kit, DakoCytomation) and counterstained in hematoxylin. All incubations were carried out in a capillary gap principle-based automated immunostainer (TechMate Horizon, DakoCytomation). For each specimen a negative control was included using preimmune rabbit serum instead of primary antibody. EnVision™ G/2 Doublestain System (Dako) was used for the simultaneous detection of CD68 and LSECtin, following the manufacturer's recommendations with a mouse monoclonal antibody against CD68 (Dako) and the polyclonal antiserum ADS4. Blockade of endogenous peroxidase and alkaline phosphatase activities was accomplished with 0.5% H₂O₂ and enzymatic inhibitors (Dako). After addition of the anti-CD68 antibody (1/100 dilution) for 30 minutes, tissue was incubated with dextran polymer-conjugated HRP-labeled antisera against murine and rabbit immunoglobulins, and CD68-specific staining detected with DAB. After using the Doublestain block reagent (Dako), tissue section were sequentially incubated with the LSECtin-specific antisera (1/500 dilution for 30 minutes) and dextran polymer-conjugated Alkaline Phosphatase-labeled antisera against murine and rabbit immunoglobulins. LSECtin staining was visualized with Permanent Red, and samples were later counterstained in hematoxylin

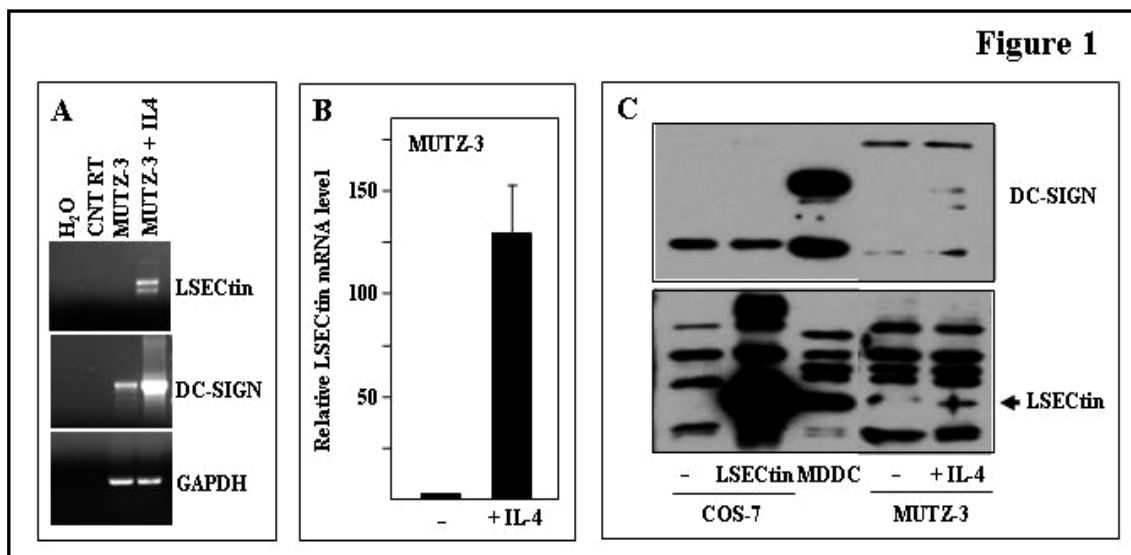
Chromatin immunoprecipitation.- Chromatin immunoprecipitation assays were performed using the Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate Biotechnology Inc., Charlottesville, VA) following the manufacturer's instructions. MDCC cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 5 min at 37°C. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed in 200 µl of a solution containing 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, and including 1 µg/ml of aprotinin, leupeptin and pepstatin and 1 mM PMSF. Chromatin samples were sonicated with 4 sets of 10-second pulses at 30% maximum power in a Sonifier S-150D, to reduce DNA length to approximately 200-600 bp. Sonicated lysates were then diluted to 2 ml with 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, and 20 µl of this solution were removed for later PCR analysis (Input aliquot). After pre-clearing with salmon sperm DNA/Protein A Agarose for 1 h at 4°C, antibodies (2 µg) were added, and sonicated lysates were incubated overnight at 4°C in a rocking

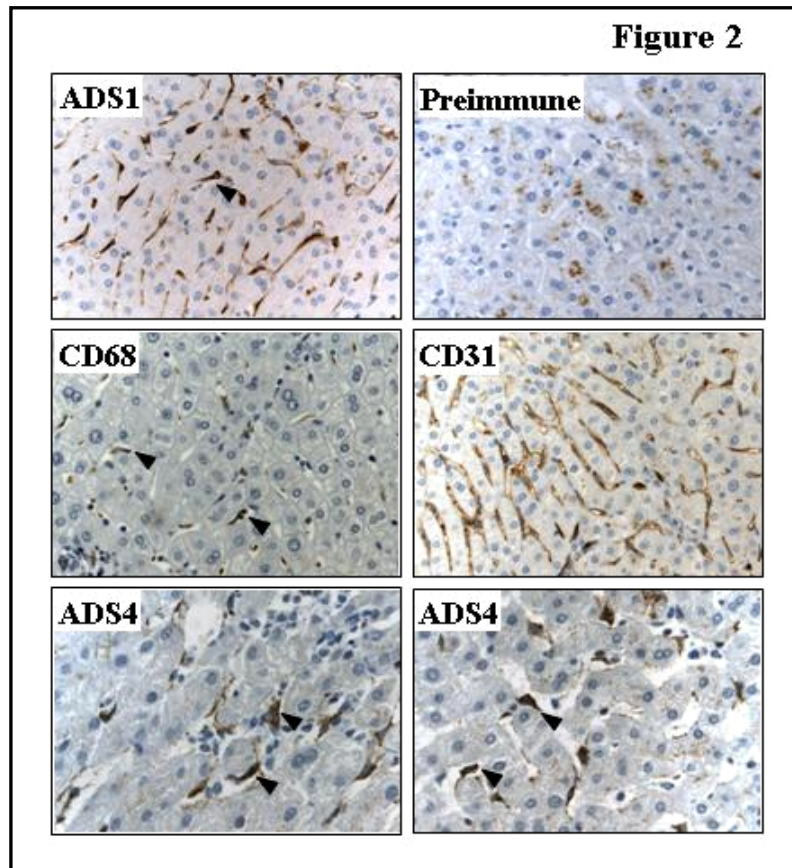
platform. Immune complexes were collected with 60 μ l of salmon sperm DNA/Protein A Agarose (1 h at 4°C), and agarose beads washed with solutions of increasing ionic strength. After a final wash in 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, bound immune complexes were eluted in a freshly prepared solution of 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, and cross-linking was reversed (in the samples and the input aliquot) by heating at 65°C for 4h. Samples were then treated with Proteinase K, and DNA was phenol-chloroform-extracted and precipitated. DNA was resuspended (20 μ l) and 2 μ l used for detection of the LSEctin promoter by PCR using the oligonucleotides 5'- CCAAGC TTGGTACTAAGCTCCAAAGAGAAG -3' and 5'- GGGGTACCCGATGCAGGC ACCCAGTCC -3', which together amplify a 312 and 263 bp fragment spanning from -296/-247 to +16. DNA from the "Input" aliquot was resuspended in 20 μ l and 2 μ l was used for PCR. Immunoprecipitating antibodies included affinity-purified rabbit polyclonal antibody against human PU.1 (sc-352, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and purified polyclonal rabbit IgG as a control.

Quantitative real-time RT-PCR.- Oligonucleotides for LSEctin and GAPDH genes were designed according to the Roche software for quantitative real time PCR. Total RNA from MDDC and THP-1 cells was extracted using the RNAeasy kit (Qiagen), retrotranscribed and amplified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicates and results normalized according to the expression levels of GAPDH. Results were processed with the BioRad iQ5 2.0 software, and the results expressed relative to the mRNA level of control or untreated samples (Relative mRNA level).

RESULTS

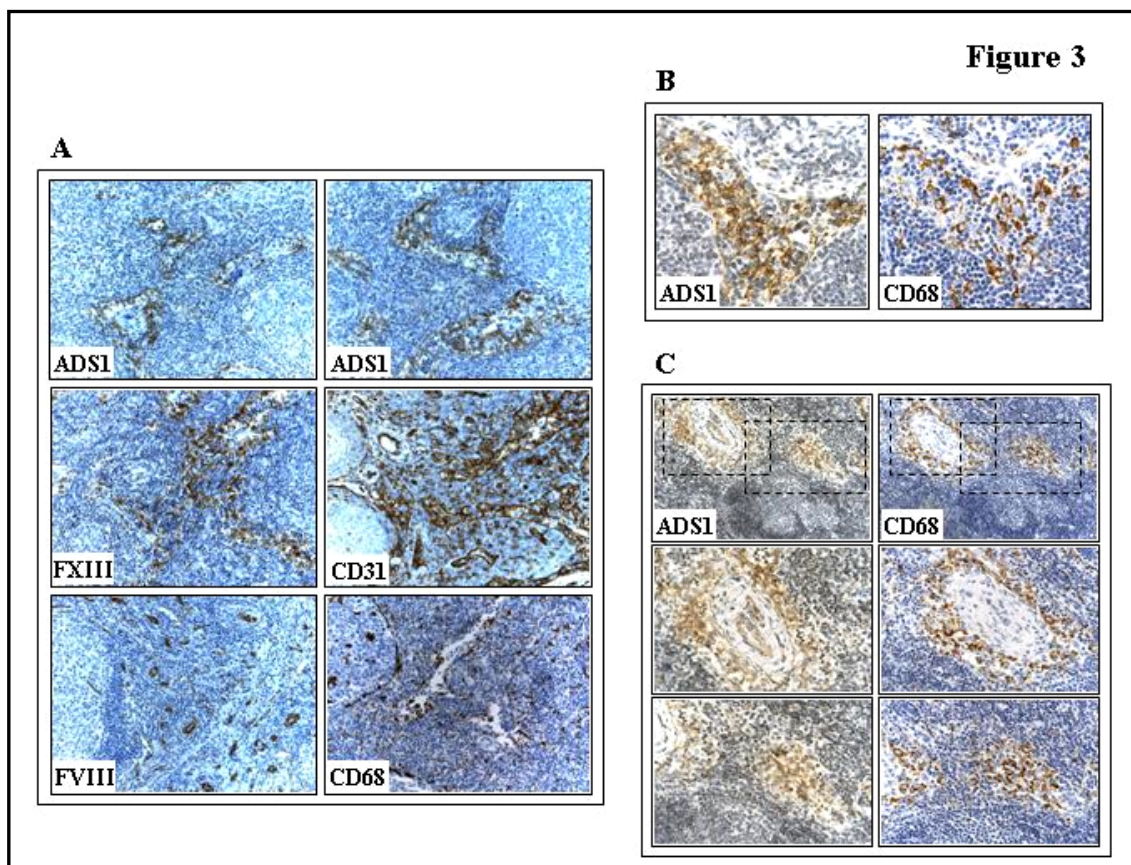
Expression of LSECtin in the human MUTZ-3 myeloid cell line.- We have previously reported the expression of LSECtin in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells, as well as in differentiated myeloid leukemia THP-1 cells (5). To further extend these findings, the presence of the lectin was analyzed in the human CD34(+) acute myeloid leukemia cell line MUTZ-3 (23, 28, 29), which exhibit the capability to differentiate towards dendritic cells (28). As shown in Figure 1A, LSECtin mRNA was barely detectable in MUTZ-3 cells grown in the continuous presence of GM-CSF, but was greatly increased upon IL-4-mediated dendritic differentiation. Quantitative RT-PCR revealed that the level of LSECtin mRNA increased more than 100-times after IL-4 addition (Figure 1B), in agreement with previous results (5). Moreover, LSECtin protein was also detected in IL-4-treated MUTZ-3 cells by Western blots using a polyclonal antisera specific for the LSECtin neck domain (5) (Figure 1C). Therefore, LSECtin is expressed not only in monocyte-derived myeloid cells but also in human myeloid cells with the capability to acquire a dendritic cell-like phenotype.

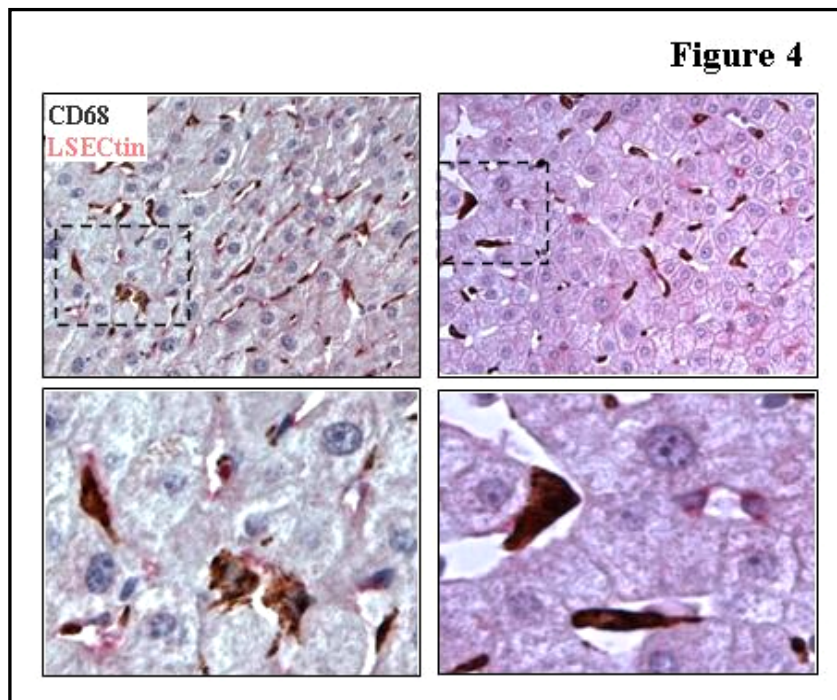




Cellular distribution of LSEctin in liver cells.- Since LSEctin was originally reported as a liver and lymph node sinusoidal-specific molecule (4), and in order to identify the LSEctin-expressing cells within hepatic tissue, we made use of rabbit polyclonal antisera against the stalk region (ADS1 antiserum) or the whole extracellular region (ADS4 antiserum) of human LSEctin (5). As shown in Figure 2, the LSEctin-specific ADS1 and ADS4 antisera stained cells with a dendritic-like appearance within the sinusoids, a morphology consistent with Kupffer cells. Parallel analysis with myeloid- and endothelial cell-specific markers revealed that anti-CD31 exclusively stained sinusoidal endothelial cells whereas anti-CD68 only marked intra-sinusoidal Kupffer cells (Figure 2). Comparison of the staining patterns evidenced that LSEctin-specific antisera recognized Kupffer cells as well as some cells lining the hepatic sinusoids (Figure 2), suggesting that LSEctin can be found in both Kupffer cells and other cells in the sinusoid wall. The presence of LSEctin on CD68+ macrophages was also suggested upon analysis of human lymph node sections, where LSEctin staining differed from that of anti-CD31 and anti-Factor VIII (endothelium-specific) and resembled the tissue staining pattern yielded by a Factor XIII-specific antibody (macrophage/dendritic cell-

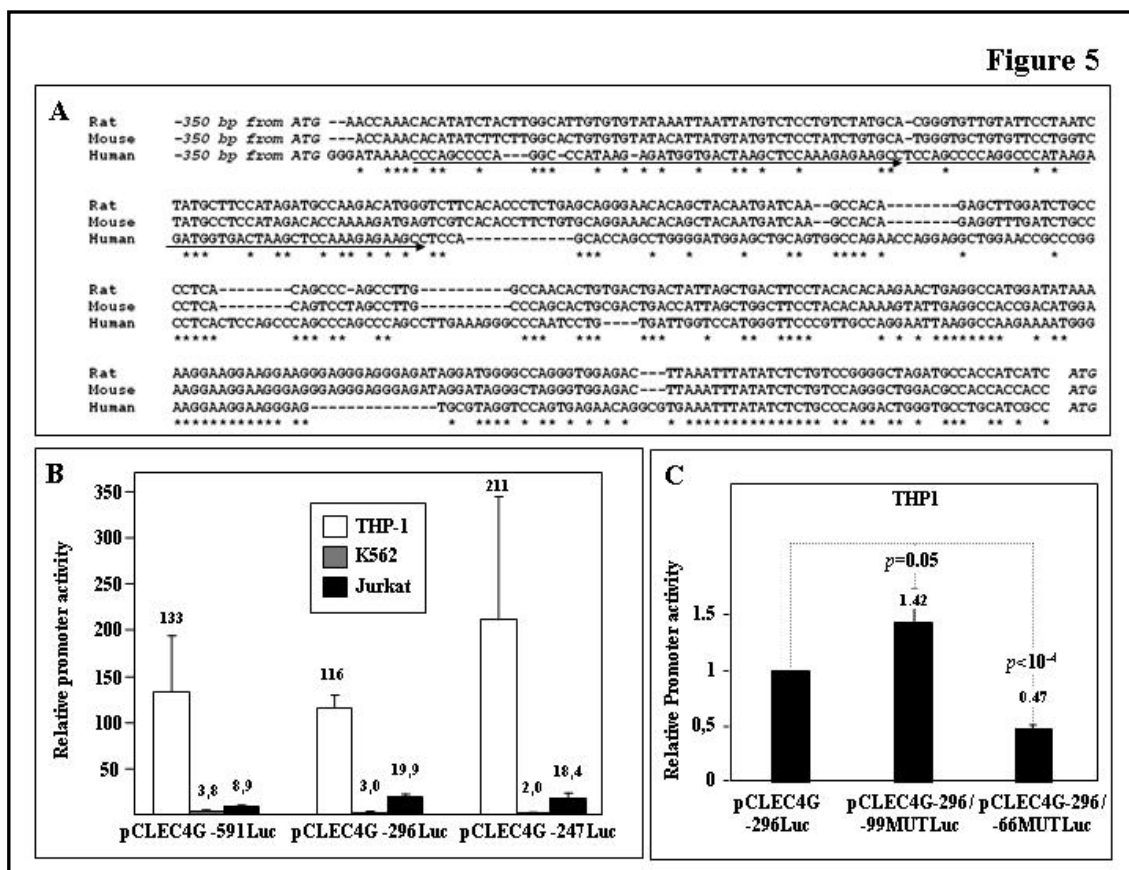
specific) (Figure 3A). Moreover, LSECtin-positive cells were preferentially observed in lymph node areas enriched in CD68+ macrophages (Figure 3B,C). Double-labeling experiments further confirmed the presence of LSECtin in both CD68+ and CD68-negative cells (Figure 4), thus suggesting the presence of LSECtin in other cell types besides Kupffer cells. Therefore, immunohistochemistry on human liver sections indicated that LSECtin is found in myeloid Kupffer cells and other liver cell types, but it is not detected on most sinusoidal endothelial cells, thus suggesting that the high levels of LSECtin mRNA detected in liver (4) are mostly due to its expression in Kupffer cells. Further support for the presence of LSECtin in Kupffer cells was obtained after detection of the LSECtin orthologue in isolated murine liver cell subsets (hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal cells and Ito cells), as murine LSECtin was readily amplified from Kupffer cell RNA, and its presence correlated with the expression of the myeloid cell-specific PU.1 transcription factor (data not shown).





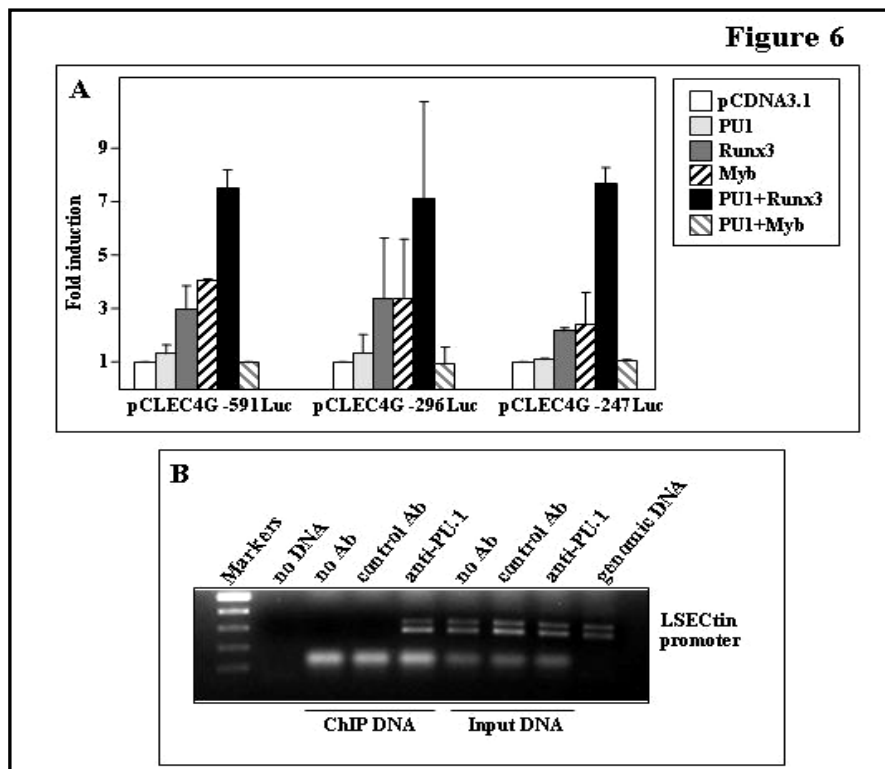
Involvement of PU.1 in the myeloid expression of LSECtin.- The DC-SIGN lectin is expressed in human myeloid cells, and its expression is regulated by PU.1 (26), a member of the Ets family of transcription factors. The expression of LSECtin in myeloid cells (5), and the correlation between PU.1 and LSECtin expression in murine liver cells (data not shown), suggested that this transcription factor might participate in the restricted expression of LSECtin. This hypothesis was supported by the presence of a DNA element at position -66 close within the LSECtin gene proximal regulatory region, and which includes three potential Ets-binding sequences (TTCCTTCCTCC) (Figure 5A). In fact, alignment of the corresponding proximal regulatory regions of the human, murine and rat LSECtin genes indicated that this putative Ets-binding sequences is highly conserved (Figure 5A). To determine whether PU.1 influences the activity of the LSECtin gene, its proximal regulatory region was isolated and its activity evaluated by means of reporter gene assays. Three distinct constructs derived from the LSECtin promoter exhibited promoter activity well above the promoterless pXP2 plamid (Figure 5B). More importantly, the activity of the three constructs was significantly higher in cells of myeloid origin and with the ability to express LSECtin (THP-1) than in erythroleukemic (K562) and T lymphoid cells (Jurkat), that do not express LSECtin (Figure 5B). Therefore, the proximal regulatory region of the LSECtin promoter

preferentially functions within a myeloid context, providing a molecular explanation for the presence of the lectin in normal and leukemic myeloid cells. The relevance of the -66 putative Ets-binding element in LSEctin promoter activity was evaluated after mutation of the three putative Ets cognate sequences in the context of the pCLEC4G -296Luc construct. As shown in Figure 5C, the resulting pCLEC4G-296/-66MUTLuc construct exhibited significantly lower activity in the THP-1 myeloid cell line than the wild type pCLEC4G -296Luc reporter construct ($p < 10^{-4}$). As a control, mutation of the sequence at -99, which also resembles an Ets-binding site, did not reduce the activity of the LSEctin proximal promoter (Figure 5C). These results indicate that the activity of the LSEctin gene regulatory region in myeloid cells is partly dependent on the integrity of the sequence around -66, which includes three potential binding sites for Ets family members.

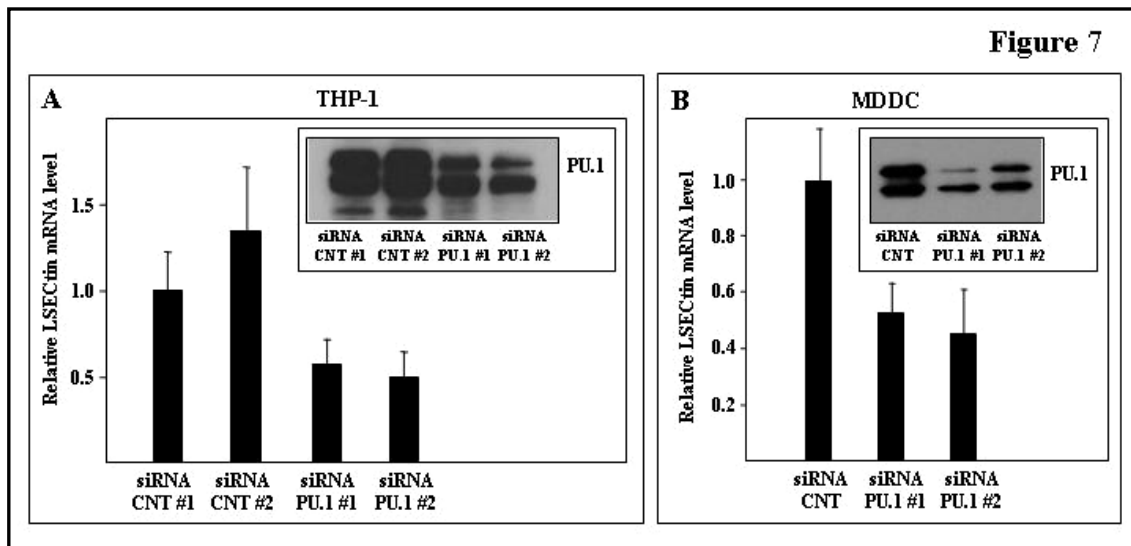


Next, since PU.1 is a myeloid-restricted Ets transcription factor, we evaluated its ability to modulate the function of the LSEctin proximal promoter. In agreement with its preferential activity in myeloid cells, both Myb and RUNX3 transactivated the LSEctin

regulatory region in a non-hematopoietic cellular context (Figure 6A). More importantly, PU.1 overexpression led to a further enhancement of the LSECTin promoter activity in the presence of RUNX3 (Figure 6A), although it reduced the transactivation ability of c-Myb (Figure 6A). Therefore, PU.1 positively modulates the LSECTin promoter activity in the presence of transcription factors which, like RUNX3, are preferentially expressed in hematopoietic cells. Considering the above results, we decided to determine whether the LSECTin regulatory region is actually occupied by PU.1 *in vivo* in LSECTin-expressing myeloid cells. To that end, genomic DNA was isolated from monocyte-derived dendritic cells, crosslinked with formaldehyde and subjected to chromatin immunoprecipitation with an anti-PU.1 polyclonal antiserum. As shown in Figure 6B, the LSECTin promoter was readily amplified from the DNA precipitated with the anti-PU.1 antibody, whereas no amplification was detected in the DNA brought down by a control antibody or in the absence of antibody. The presence of two distinct bands derived from the LSECTin promoter (Figure 6B) is due to the fact that the forward oligonucleotide anneals within a direct repeat within the LSECTin proximal regulatory region (underlined in Figure 5A). Therefore, the expression of LSECTin correlates with that of the PU.1 transcription factor, which binds to and enhances the activity of the LSECTin proximal regulatory region in LSECTin-expressing cells of myeloid origin.



Finally, to obtain a direct evidence for the PU.1 contribution to LSECtin expression, the consequence of knocking down PU.1 protein levels by means of siRNA was determined in LSECtin-expressing cells. To that end, THP-1 cells were nucleofected with a PU.1-specific siRNA which reduces PU.1 levels by more than 50% (Figure 7A, insert). The decrease in PU.1 protein levels resulted in a subsequent downmodulation of the LSECtin mRNA levels, as determined by quantitative RT-PCR (Figure 7A). Besides, and compared to cells nucleofected with a control siRNA, nucleofection of the PU.1-specific siRNA also caused a reduction in the steady-state level of LSECtin mRNA in monocyte-derived dendritic cells (Figure 7B). Therefore, diminishing PU.1 expression had a direct impact on the LSECtin RNA levels in both cell types, thus confirming the involvement of PU.1 in LSECtin gene expression.



DISCUSSION

In the present manuscript we provide evidences that the expression of the LSECtin pathogen-attachment lectin, originally described as a sinusoidal-specific molecule (4), is expressed in cells of myeloid origin within the liver, and that the PU.1 transcription factor contributes to its restricted expression. The myeloid expression of LSECtin allows the definition of a chromosome 19 cluster of lectin-encoding genes (CD23, DC-SIGN and LSECtin) whose expression is detected in professional antigen-presenting cells (macrophages and dendritic cells) and which might critically participate in the process of antigen capture during immune responses. In this regard, the expression of the three lectins is dramatically downregulated upon dendritic cell maturation (data not shown), suggesting that they function primarily in immature dendritic cells, essential for the establishment of the peripheral tolerance, and that their antigen-capturing ability is either dispensable or detrimental once dendritic cells acquire their full T cell activating and polarizing capacity. Like in the case of DEC-205 (30) and DC-SIGN (31), the generation of LSECtin-specific reagent will be a very useful tool to evaluate its potential role as a tolerance-promoting capturing receptor.

The inducibility of CD23, DC-SIGN and LSECtin expression by IL-4 (5, 7, 9) suggests the presence of a common mechanism for their expression in myeloid cells. We have previously demonstrated that the activity of the DC-SIGN promoter is regulated by the myeloid-specific transcription factor PU.1, whose level of expression is critically dependent on the presence of IL-4 (26). The present report demonstrates that PU.1 is also involved in the expression of LSECtin, since 1) PU.1 is constitutively bound to the LSECtin proximal promoter *in vivo*; 2) PU.1 potentiates the activity of the LSECtin regulatory region; and 3) PU.1 downmodulation translates into diminished levels of LSECtin mRNA in both leukemic and primary LSECtin⁺ cells. Although induced by IL-4 (7), the participation of PU.1 in the expression of CD23 has not been reported, but it is tempting to hypothesize that PU.1 might also regulate CD23 expression, specially considering their overlapping patterns of expression. If this is the case, PU.1 would become an essential component for the expression of the three antigen-capturing and pathogen-attachment lectins encoded within the chromosome 19p13.2 gene cluster. However, although PU.1 appears as a requirement for DC-SIGN and LSECtin

expression, it is not sufficient for their expression, because several PU.1-expressing myeloid cell types are devoid of both lectins (e.g., neutrophils). It is therefore possible that a threshold level of PU.1 is required for both lectins to be expressed, and that IL-4 might induce their expression primarily through an increase in PU.1 expression. Alternatively, IL-4 might activate a signaling pathway/transcription factor which ultimately synergizes with PU.1 for the induction of both lectins. An obvious potential candidate would be STAT6, which functionally collaborates with PU.1, appears to bind to the CD23 gene regulatory region, and whose transcriptional activity is induced by IL-4 (32). However, no obvious STAT6-binding sequences are located within the LSECTin proximal regulatory region, and STAT6 does not influence the activity of the DC-SIGN promoter in spite of the presence of three element with STAT6-binding ability *in vitro* (data not shown).

A second potential factor that might participate in the IL-4 inducibility of the three lectins would be PPAR γ , whose activity and expression is also controlled by IL-4 (33). In fact, PPAR γ expression is currently considered as a hallmark for the alternative activation of macrophages (34, 35), which results in the induction of both LSECTin (5) and DC-SIGN (10). However, the synthetic PPAR γ ligand GW7845 or the PPAR antagonist inhibitor GW9662 did not modify the basal or inducible expression of either LSECTin or DC-SIGN (data not shown), thus arguing against a role for PPAR γ in the control of the expression of both lectins. Therefore, the identity of the transcription factors which contribute with PU.1 to the IL-4 inducibility of the CD23, DC-SIGN and LSECTin genes remains to be determined.

The IL-4-dependency of the three lectins encoded within the chromosome 19p13.2 gene cluster also raises the question of their preferential involvement in Th2-biased immune responses and whether their basal expression in cells under homeostatic non-inflammatory conditions is independent on IL-4. On the first issue, it has been well established that CD23 has a regulatory role on the levels of IgE (7). Conversely, the participation of DC-SIGN and LSECTin in Th2 responses is unclear, apart from the fact that they might contribute to the elimination of pathogens which induced Th2-skewed immune responses (36). Regarding the expression of both lectins in non-inflamed homeostatic conditions, preliminary experiments indicate that IL-4 is not responsible for

the basal level of LSECTin in liver, since IL-4R α -deficient mice exhibit similar levels of LSECTin mRNA as wild type mice (data not shown)

The data in the present manuscript may also help resolving the issue of the cellular distribution of LSECTin in liver tissue. The presence of LSECTin mRNA in Kupffer cell preparations from rat and mouse liver (data not shown), together with the immunohistochemistry data, support the preferential expression of LSECTin in cells of myeloid origin, what would be compatible with the PU.1-dependency of the LSECTin expression. In fact, analysis of the various murine liver cell subsets indicate a very good correlation between the presence of PU.1 and LSECTin mRNA, further confirming the myeloid nature of the LSECTin-expressing cells (data not shown). The expression of LSECTin in Kupffer cells might contribute to clarify its primary function. Kupffer cells constitute more than 80% of the tissue macrophages present in the body and are the first macrophage population exposed to material derived from the gastrointestinal tract (19). The removal of bacteria-derived products and microbial debris by Kupffer cells is mediated through a large array of scavenging molecules on their cell surface, and LSECTin could be an additional molecule engaged in their clearance function. The ability of LSECTin to interact with virally-encoded molecules and glycoproteins with truncated complex and hybrid N-linked glycans (6) suggests its role as a scavenging molecule. Moreover, biochemical studies using recombinant LSECTin indicates its ability to specifically interact with serum proteins (data not shown). On the other hand, and by analogy with DC-SIGN (37), LSECTin could be also implicated in cell-cell adhesion. If so, LSECTin might participate in either attachment of Kupffer cells to liver sinusoidal cells or in Kupffer cell interactions with Ito cells, a process which has proven relevant during liver tissue injury and repair (38, 39). Unlike DC-SIGN, the existence of a murine orthologue of LSECTin gene will be helpful for the generation of animal models where both possibilities can be evaluated.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Expression of LSECTin in the MUTZ-3 cell line.- (A) Detection of LSECTin, DC-SIGN and GAPDH mRNA in untreated and IL-4-treated MUTZ-3 by means of conventional RT-PCR. The results of control experiments without RNA (H₂O) or without reverse transcriptase (CNT RT) are shown in each case. (B) Relative levels of LSECTin mRNA in untreated (-) and IL-4-treated MUTZ-3 cells by means of quantitative RT-PCR, after normalization for the levels of 18S RNA. Determination was done in triplicate, and the mean and standard deviation is shown. (C) Detection of DC-SIGN and LSECTin protein expression in untreated (-) and IL-4-treated MUTZ-3 cells by Western blot, using a polyclonal antiserum against their corresponding neck regions. For control purposes, the expression of both lectins in MDDC and untransfected or LSECTin-transfected COS-7 is shown.

Figure 2.- LSECTin expression in human liver.- Immunolocalization of LSECTin, CD68 and CD31 on formalin-fixed, paraffin-embedded human liver tissue sections. LSECTin was detected with rabbit polyclonal antisera against the neck domain (ADS1, upper left panel, Magnification 20X) or the whole extracellular region (ADS4, lower panels, Magnification 40X). The upper right panel shows the staining yielded by a preimmune rabbit antiserum (Magnification 20X). Arrows indicate the position of LSECTin- or CD68-positive cells in their respective panels.

Figure 3.- LSECTin expression in human lymph nodes.- (A) Immunolocalization of LSECTin, Factor XIII (FXIII) CD68, CD31 and Factor VIII (FVIII) on formalin-fixed, paraffin-embedded human lymph node tissue sections at 20X Magnification. LSECTin was detected with rabbit polyclonal antisera against the neck domain (ADS1, upper panels). (B,C) Detection of LSECTin-positive cells in human lymph node tissue section areas enriched in CD68-positive cells. In C, the areas marked by boxes are shown in the lower panels at higher magnification (40X).

Figure 4.- Co-expression of LSECtin and the CD68 myeloid-specific marker in human liver tissue sections.- Simultaneous immunolocalization of LSECtin (Red) and CD68 (Brown) on formalin-fixed, paraffin-embedded human liver tissue sections (40X Magnification). Two different preparation are shown (upper panels). The areas marked by boxes are shown in the lower panels at higher magnification.

Figure 5.- Structural and functional analysis of the LSECtin gene proximal regulatory region.- (A) Sequence alignment of the proximal regulatory regions (from -350 to the translation initiation site) of the human, murine and rat LSECtin genes. Identities are shown by asterisks below the sequences. The position of the 48-nucleotide direct repeats within the human LSECtin promoter is indicated by arrows below the sequence. (B) THP-1, K562, and Jurkat cells were transfected with the indicated reporter plasmids, and luciferase activity was determined after 24 h. Promoter activity is expressed relative to the activity produced by the promoter-less pXP2 plasmid in each cell type and after normalization for transfection efficiency. Data represent the mean \pm SD of four independent experiments using two different DNA preparations. (C) THP-1 cells were transfected with the indicated reporter plasmids, and luciferase activity was determined after 24 h. Promoter activity is expressed relative to the activity produced by the wild type pCLEC4G -296Luc construct after normalization for transfection efficiency. Data represent the mean \pm SD of four independent experiments.

Figure 6.- PU.1 binds *in vivo* and modulates the activity of the LSECtin promoter *in vitro*.- (A) The activity of the proximal LSECtin gene promoter is modulated by PU.1, RUNX3 or Myb. NIH-3T3 cells were transfected with the indicated LSECtin promoter-based reporter plasmids in the presence of an empty expression vector (pCDNA3.1) or expression vectors for RUNX3, Myb or PU.1, either alone or in combination. For each individual reporter construct, -fold induction represents the luciferase activity yielded by each expression vector combination relative to the activity produced by an identical amount of empty CMV-0 plasmid. In all cases, total DNA was kept constant (1.5 μ g) by adding CMV-0 plasmid DNA, and luciferase activity was determined after 24h. Data represent mean \pm S.D. of three independent experiments using two different DNA preparations. (B) *In vivo* occupancy of the LSECtin proximal

promoter by PU.1. Shown are chromatin immunoprecipitations on immature monocyte-derived dendritic cells using an affinity-purified polyclonal antiserum specific for PU.1, a nonspecific affinity-purified antiserum (control Ab), or no antibody (no Ab). Immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using a pair of LSEctin promoter-specific primers which together amplify 312 and 263 bp fragments spanning from -296/-247 to +16, since the forward primer anneals to a 48-nucleotide direct repeat. “Input DNA” lanes represent the PCR analysis performed on DNA from a 1:20 dilution of the starting sonicated lysate. Additional controls include amplification in the absence of DNA (no DNA) or amplification of human genomic DNA (genomic DNA).

Figure 7.- Knockdown on PU.1 results in diminished LSEctin mRNA levels.- THP-1 cells (A) or MDDC (B) were nucleofected with either siRNA for PU.1 (siRNA PU.1) or a control siRNA (siRNA CNT). After 24 h, total RNA was isolated and LSEctin mRNA measured by quantitative RT-PCR. Each experiment was performed in duplicate, and both experiments are shown. Results are expressed as “Relative LSEctin mRNA level”, which indicates the level of LSEctin mRNA in each sample relative to its level in control siRNA-nucleofected cells. To confirm siRNA efficiency in each individual experiment, one-third of the cells were lysed and subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1 (inserts).

REFERENCES

1. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575.
2. Soilleux, E. J., R. Barten, and J. Trowsdale. 2000. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 165:2937.
3. Bashirova, A. A., T. B. Geijtenbeek, G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, J. B. Eilering, M. P. Martin, L. Wu, T. D. Martin, N. Viebig, P. A. Knolle, V. N. KewalRamani, Y. van Kooyk, and M. Carrington. 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193:671.
4. Liu, W., L. Tang, G. Zhang, H. Wei, Y. Cui, L. Guo, Z. Gou, X. Chen, D. Jiang, Y. Zhu, G. Kang, and F. He. 2004. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem* 279:18748.
5. Dominguez-Soto, A., L. Aragonese-Fenoll, E. Martin-Gayo, L. Martinez-Prats, M. Colmenares, M. Naranjo-Gomez, F. E. Borrás, P. Munoz, M. Zubiaur, M. L. Toribio, R. Delgado, and A. L. Corbi. 2007. The DC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood* 109:5337.
6. Gramberg, T., H. Hofmann, P. Moller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch, and S. Pohlmann. 2005. LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* 340:224.
7. Kijimoto-Ochiai, S. 2002. CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule. *Cell Mol Life Sci* 59:648.
8. Yu, P., M. Kosco-Vilbois, M. Richards, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369:753.

9. Relloso, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, J. L. Rodriguez-Fernandez, G. de la Rosa, N. Longo, J. Navarro, M. A. Munoz-Fernandez, P. Sanchez-Mateos, and A. L. Corbi. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* 168:2634.
10. Puig-Kroger, A., D. Serrano-Gomez, E. Caparros, A. Dominguez-Soto, M. Relloso, M. Colmenares, L. Martinez-Munoz, N. Longo, N. Sanchez-Sanchez, M. Rincon, L. Rivas, P. Sanchez-Mateos, E. Fernandez-Ruiz, and A. L. Corbi. 2004. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem* 279:25680.
11. Soilleux, E. J., L. S. Morris, G. Leslie, J. Chehimi, Q. Luo, E. Levroney, J. Trowsdale, L. J. Montaner, R. W. Doms, D. Weissman, N. Coleman, and B. Lee. 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 71:445.
12. Engering, A., S. J. Van Vliet, T. B. Geijtenbeek, and Y. Van Kooyk. 2002. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100:1780.
13. van Lent, P. L., C. G. Figdor, P. Barrera, K. van Ginkel, A. Sloetjes, W. B. van den Berg, and R. Torensma. 2003. Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells. *Arthritis Rheum* 48:360.
14. Engering, A., S. J. van Vliet, K. Hebeda, D. G. Jackson, R. Prevo, S. K. Singh, T. B. Geijtenbeek, H. van Krieken, and Y. van Kooyk. 2004. Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes. *Am J Pathol* 164:1587.
15. Granelli-Piperno, A., A. Pritsker, M. Pack, I. Shimeliovich, J. F. Arrighi, C. G. Park, C. Trumpfheller, V. Piguet, T. M. Moran, and R. M. Steinman. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph

- node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* 175:4265.
16. Mukhtar, M., S. Harley, P. Chen, M. BouHamdan, C. Patel, E. Acheampong, and R. J. Pomerantz. 2002. Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* 297:78.
 17. Pohlmann, S., E. J. Soilleux, F. Baribaud, G. J. Leslie, L. S. Morris, J. Trowsdale, B. Lee, N. Coleman, and R. W. Doms. 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2670.
 18. Powlesland, A. S., T. Fisch, M. E. Taylor, D. F. Smith, B. Tissot, A. Dell, S. Pohlmann, and K. Drickamer. 2007. A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans. *J Biol Chem*.
 19. Bilzer, M., F. Roggel, and A. L. Gerbes. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 26:1175.
 20. Naito, M., G. Hasegawa, Y. Ebe, and T. Yamamoto. 2004. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37:16.
 21. Laskin, D. L., B. Weinberger, and J. D. Laskin. 2001. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol* 70:163.
 22. Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis. 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 12:7413.
 23. Quentmeier, H., A. Duschl, Z. B. Hu, B. Schnarr, M. Zaborski, and H. G. Drexler. 1996. MUTZ-3, a monocytic model cell line for interleukin-4 and lipopolysaccharide studies. *Immunology* 89:606.
 24. Masterson, A. J., C. C. Sombroek, T. D. De Gruijl, Y. M. Graus, H. J. van der Vliet, S. M. Loughheed, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, and R. J. Scheper. 2002. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* 100:701.
 25. Larsson, K., M. Lindstedt, and C. A. Borrebaeck. 2006. Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology* 117:156.

26. Dominguez-Soto, A., A. Puig-Kroger, M. A. Vega, and A. L. Corbi. 2005. PU.1 regulates the tissue-specific expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem* 280:33123.
27. Nordeen, S. K. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454.
28. Santegoets, S. J., A. J. Masterson, P. C. van der Sluis, S. M. Lougheed, D. M. Fluitsma, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, R. J. Scheper, and T. D. de Gruijl. 2006. A CD34(+) human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14(+)CD11b(+) Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol* 80:1337.
29. Santegoets, S. J., M. W. Schreurs, A. J. Masterson, Y. P. Liu, S. Goletz, H. Baumeister, E. W. Kueter, S. M. Lougheed, A. J. van den Eertwegh, R. J. Scheper, E. Hooijberg, and T. D. de Gruijl. 2006. In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line. *Cancer Immunol Immunother* 55:1480.
30. Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, A. Charalambous, D. I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M. K. Brimnes, B. Moltedo, T. M. Moran, and R. M. Steinman. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199:815.
31. Tacke, P. J., I. J. de Vries, K. Gijzen, B. Joosten, D. Wu, R. P. Rother, S. J. Faas, C. J. Punt, R. Torensma, G. J. Adema, and C. G. Figdor. 2005. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 106:1278.
32. Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck, and A. Duschl. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:173.
33. Huang, J. T., J. S. Welch, M. Ricote, C. J. Binder, T. M. Willson, C. Kelly, J. L. Witztum, C. D. Funk, D. Conrad, and C. K. Glass. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400:378.
34. Bouhlel, M. A., B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievart, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi.

2007. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6:137.
35. Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. R. Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante, and A. Chawla. 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116.
36. Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, A. L. Corbi, and L. Rivas. 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* 277:36766.
37. Ludwig, I. S., T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2006. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol* 6:408.
38. Duffield, J. S., S. J. Forbes, C. M. Constandinou, S. Clay, M. Partolina, S. Vuthoori, S. Wu, R. Lang, and J. P. Iredale. 2005. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115:56.
39. Friedman, S. L. 2005. Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 115:29.

3.- Regulación de la expresión tejido-específica de DC-SIGN en células dendríticas.

DC-SIGN ("Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin") es una lectina tipo C expresada en células dendríticas derivadas de monocitos y en ciertas poblaciones de macrófagos. DC-SIGN media la captura antigénica para un posterior procesamiento y presentación, además de participar en la interacción intercelular con linfocitos T vírgenes y células endoteliales. En su estrategia para evadir el sistema inmune, numerosos microorganismos patogénicos, incluido HIV y el virus Dengue, se unen a DC-SIGN con el fin de acceder a las células dendríticas. La existencia de polimorfismos en la región reguladora asociados a la susceptibilidad al virus Dengue, así como la relevancia funcional de los niveles de expresión de DC-SIGN, nos han llevado al estudio de la región reguladora proximal de dicha molécula. En este estudio se presentan evidencias de que el factor de transcripción PU.1 dirige la actividad basal y tejido específica de la región reguladora del gen de DC-SIGN a través de la ocupación *in vivo* de dos elementos Ets funcionales, cuya integridad es requerida para la acción de PU.1 y para las acciones cooperativas de PU.1 con otros factores de transcripción, como Myb y RUNX. DC-SIGN y PU.1 se expresan de forma coordinada durante la maduración de células dendríticas y la activación de macrófagos. Por otra parte, la reducción de la expresión de PU.1 provoca una disminución de los niveles celulares de DC-SIGN. Por todo ello, estos resultados indican que PU.1 está implicado en la expresión mieloide-específica de DC-SIGN, una contribución acorde con el papel que tiene PU.1 en la adquisición del repertorio molecular de captación antigénica por células dendríticas y macrófagos.

PU.1 Regulates the Tissue-specific Expression of Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-3-grabbing Nonintegrin*

Received for publication, March 29, 2005, and in revised form, June 13, 2005. Published, JBC Papers in Press, July 28, 2005, DOI 10.1074/jbc.M503401200

Ángeles Domínguez-Soto¹, Amaya Puig-Kröger², Miguel A. Vega, and Angel L. Corbi³

From the Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid 28040, Spain

Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) is a cell surface C-type lectin expressed on myeloid dendritic cells and certain tissue macrophages, which mediates antigen capture for processing and presentation and participates in intercellular interactions with naive T lymphocytes or endothelial cells. In their strategy to evade immunosurveillance, numerous pathogenic microorganisms, including human immunodeficiency virus and *Mycobacterium*, bind to DC-SIGN in order to gain access to dendritic cells. We present evidence that PU.1 dictates the basal and cell-specific activity of DC-SIGN gene-regulatory region through *in vivo* occupancy of two functional *Ets* elements, whose integrity is required for PU.1 responsiveness and for the cooperative actions of PU.1 and other transcription factors (Myb, RUNX) on the DC-SIGN gene proximal regulatory region. In addition, protein analysis and gene profiling experiments indicate that DC-SIGN and PU.1 are coordinately expressed upon classical and alternative macrophage activation and during dendritic cell maturation. Moreover, small interfering RNA-mediated reduction of PU.1 expression results in diminished DC-SIGN cellular levels. Altogether, these results indicate that PU.1 is involved in the myeloid-specific expression of DC-SIGN in myeloid cells, a contribution that can be framed within the role that PU.1 has on the acquisition of the antigen uptake molecular repertoire by dendritic cells and macrophages.

Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN⁴; CD209) (1) is a type II membrane protein and C-type lectin whose carbohydrate-binding domain is followed by a "neck" region with seven 23-amino acid repeats, a transmembrane region, and a short cytoplasmic tail with recycling and internalization motifs (2, 3). DC-SIGN is preferentially expressed on myeloid dendritic cells (3, 4) and is usually considered as a dendritic cell (DC)-specific phenotypic marker. However, although DC-SIGN expression *in vivo* is mainly restricted to interstitial DC (5), it has also been detected on

synovial, placenta, and alveolar macrophages and on a small subset of CD14+ peripheral blood DC (6–9). DC-SIGN expression is induced *de novo* by IL-4 during the *in vitro* generation of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) (4), upon alternative activation of macrophages (7, 10) and during differentiation of THP-1 cells in the presence of protein kinase C activators (10).

Functionally, DC-SIGN mediates antigen capture for processing and presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules (11, 12), participates in the establishment of the initial contact between dendritic cells and naive T lymphocytes through its recognition of intercellular adhesion molecule-3 (3), and also mediates dendritic cell trafficking through interactions with endothelial intercellular adhesion molecule-2 (13). On the other hand, numerous reports have provided evidence that DC-SIGN function is subverted by numerous pathogens, and a large array of pathogenic microorganisms, including virus (HIV, cytomegalovirus, Ebola, hepatitis C, Dengue), bacteria (*Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*), fungi (*Candida*, *Aspergillus*), and parasites (*Leishmania*, *Schistosoma mansoni*) (reviewed in Ref. 1), bind to DC-SIGN in a mannose- or fucose-dependent manner (14–17) as a strategy to escape from immunosurveillance. Subsequent to binding to DC-SIGN, most of these pathogens initiate their replicative or infective cycle from the cytoplasm of DC-SIGN-expressing cells. In the case of HIV, DC-SIGN mediates virus binding and uptake by dendritic cells, where DC-SIGN-associated HIV remains infectious for prolonged periods of time and efficiently transfers HIV to CD4(+) T cells in lymph nodes, where viral replication occurs (18). The critical function of DC-SIGN in HIV entry and spread is illustrated by the existence of DC-SIGN promoter polymorphisms associated with increased risk of parenteral infection by HIV-1 (19). Therefore, the identification of the regulatory sequences driving DC-SIGN basal and regulated expression might provide valuable information of potential diagnostic and therapeutic relevance.

PU.1 is the most divergent member of the *Ets* family of transcription factors whose expression is restricted to myeloid and B-lymphoid cells (20, 21). PU.1 contacts DNA with a winged helix-turn-helix-type domain, binds to a *cis* element (core sequence 5'-GAGGAA-3') that is sometimes clustered with binding sites for other transcription factors, and regulates the expression of genes involved in cytokine binding (macrophage colony-stimulating factor receptor and granulocyte colony-stimulating factor receptor), cell adhesion (CD11b, CD11c, CD18, and scavenger receptors), and components of the phagocyte NADPH-dependent oxidase system (20). PU.1 is required for terminal myeloid differentiation and gene expression, and myeloid and B lymphoid lineage cells either completely fail to develop (22) or are delayed and highly aberrant (23) in PU.1 $-/-$ mice. Recent studies have demonstrated that different cellular concentrations of PU.1 may direct distinct cell fates, with the highest concentrations of PU.1 required for macrophage development and lower concentrations for granulocytic and B-cell fate adop-

* This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia Grant SAF2002-04615-C02-01 and Grant GEN2003-20649-C06-01/NAC and Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España Grant 36422/03 (to A. L. C.) and Grant GEN2003-20649-C06-06/NAC (to M. A. V.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a predoctoral grant from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

² Supported by an I3P postdoctoral contract through CSIC.

³ To whom correspondence should be addressed: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain. Tel.: 34-91-8373112 (ext. 4376); Fax: 34-91-5627518; E-mail: acorbi@cib.csic.es.

⁴ The abbreviations used are: DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin; DC, dendritic cell; IL, interleukin; MDDC, monocyte-derived dendritic cell(s); HIV, human immunodeficiency virus; MDM, monocyte-derived macrophages; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; AAMΦ, alternatively activated macrophage(s); CAMΦ, classically activated macrophage(s); contig, group of overlapping clones; siRNA, small interfering RNA.

tion (24, 25). PU.1 is also involved in the development of myeloid-derived populations of murine dendritic cells (26, 27) and promotes dendritic cell development from CD34+ human cord blood cells and generation of Langerhans cells, an effect that is blocked by CCAAT/Enhancer-binding protein α (28). In the present report, we describe the coordinated expression of PU.1 and DC-SIGN during macrophage activation and dendritic cell maturation and the critical contribution of PU.1 to the basal and tissue-specific activity of the DC-SIGN gene proximal regulatory region through occupancy of two closely located binding sites.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells by a 1-h adherence step at 37 °C in complete medium or by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). To generate MDDC, adherent or CD14+ cells (>95% monocytes) were cultured at $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES, and 2 mM glutamine (complete medium), at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing 1000 units/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Leucomax, Schering-Plough, Kenilworth, NJ) and 1000 units/ml IL-4 (PreProtech, Rocky Hill, NJ) for 5–7 days, with cytokine addition every second day. For MDDC maturation, immature MDDC were treated with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 055:B5 (10 ng/ml) for 24–48 h. To generate monocyte-derived macrophages (MDM), adherent or CD14+ cells were cultured at $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml in complete medium containing 1000 units/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (or macrophage colony-stimulating factor at 10 ng/ml) for 5 days, with cytokine addition every second day. MDM were then treated with IL-4 (1000 units/ml) or interferon- γ (500 units/ml) for 48 h to generate alternatively activated macrophages (AAM Φ) or classically activated macrophages (CAM Φ), respectively.

The K562 (chronic myelogenous leukemia) and THP-1 (monocytic leukemia) cell lines were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES, and 2 mM glutamine (complete medium) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. NIH-3T3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Induction of differentiation of THP-1 cells was accomplished in the presence of phorbol myristate acetate at 10 ng/ml. When indicated, IL-4 was added at 1000 units/ml. In differentiation experiments, cells were seeded at 5×10^5 cells/ml in tissue culture dishes with no change of the culture medium after the addition of the differentiation inducer, and differentiation was allowed to proceed for 48 h.

Transfections, Plasmids, and Site-directed Mutagenesis—Transfection in COS-7, NIH-3T3, Jurkat, and K562 cells was performed with Superfect (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Transfections were carried in 24-well plates out using 1 μ g of eukaryotic expression plasmid DNA on 4×10^4 (COS-7, NIH-3T3) or 1 μ g of firefly luciferase-based reporter plasmid and 100–200 ng of eukaryotic expression plasmid DNA on $8\text{--}15 \times 10^5$ (K562) cells. THP-1 cells were transfected using DEAE-dextran following standard procedures. In reporter gene experiments, the amount of DNA in each transfection was normalized by using the corresponding insertless expression vector (CMV-0) as carrier. Each transfection experiment was performed at least three times with different DNA preparations. Transfection efficiencies were normalized by cotransfection with the pCMV- β gal plasmid, and β -galactosidase levels were determined using the Galacto-Light kit (Tropix, Bedford, MA). The DC-SIGN-based reporter

gene constructs pCD209-1600 and pCD209-468 reporter plasmids were generated by PCR amplification of the –1656/–19 and –468/–19 fragments of the DC-SIGN promoter with oligonucleotides 5'-CCAA-GCTTTGTCAACTCACTTTCAGTTATACGTC-3', 5'-CCAAGCT-TCAATTATGATTCTGCCCAACTCC-3' and 5'-GGGGTACCA-GTGTCAGAACTCCTGGGG-3', and the resulting fragments were cloned into HindIII and KpnI-digested pXP2 plasmid, which contains the firefly luciferase cDNA (29). The pCD209-1200 reporter plasmid was generated by digestion of pCD209-1600 plasmid with BamHI and subsequent religation. Positions within the DC-SIGN regulatory regions were numbered from the ATG initiation start codon (+1). The PU.1 expression plasmid pCDNA3.1-PU.1 was obtained by cloning of the human PU.1 cDNA into EcoRI-digested pCDNA3.1(–) and selection of plasmids with properly oriented inserts.

THP-1 cells (2×10^6 cells) were transfected by nucleofection with 3 μ g of siRNA for PU.1 (sc-36330 PU.1 siRNA gene silencer; Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA) or a control siRNA using the Cell Line Nucleofector Kit V (Amama). After nucleofection, cells were maintained in culture for 24 h, and one-fifth of the cells were lysed and subjected to Western blot for detection of PU.1, DC-SIGN, or β -actin as control. Total RNA was isolated from the rest of nucleofected cells and subjected to reverse transcription-PCR for detection of DC-SIGN and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA, as previously described (10). 2 μ g of RNA from cells transfected with either PU.1-specific or control siRNA was reverse transcribed, and 5 μ l of the resulting cDNA was subjected to PCR with oligonucleotides CD209sense (5'-GGGAATTCAGAGTGGGGTGACATGAGTGAC-3') and CD209antisense (5'-CCCCAAGCTTGTGAAGTTCTGCTACGCAGGAG-3') to amplify the whole coding region of DC-SIGN. Control PCRs were performed using oligonucleotides 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3' and 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3', which together amplify a 417-bp fragment from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. PCR-generated fragments were resolved in 1.5% agarose gels.

Site-directed mutagenesis was performed on the DC-SIGN promoter construct pCD209-468 using the QuikChange system (Stratagene, La Jolla, CA). For mutation of the PU.1-111 and PU.1-77 elements, the oligonucleotides PU.1-111mutS (5'-GGATGACAGATCCCTACCC-GTCGACCTGTTTCTCTTTCTGTGGG-3'), PU.1-111mutAS (5'-CCCACAGAAAGAGAAACAGGTCGACGGGTAGGGATCTGTC-ATCC-3'), PU.1-77mutS (5'-CTGTGGGAGACTAGATTGTGCA-CGTAAAGATCACAGGGTGGG-3'), and PU.1-77mutAS (5'-CCC-ACCCTGTGATCTTTACGTCGACAATCTAGTCTCCACAG-3') were used, and the resulting plasmids were termed pCD-209-468-111MUT and pCD209-468-77MUT. All DNA constructs and mutations were confirmed by DNA sequencing. Generation of the pCD209-468-111/–77MUT plasmid, where the Ets-binding sequences at –111 and –77 are mutated, was accomplished by site-directed mutagenesis on the pCD209-468-77MUT plasmid using the oligonucleotides PU.1-111mutS and PU.1-111mutAS. Mutation of the T/C-rich region downstream from the PU.1-111 element was accomplished using the oligonucleotides CD209-105mutS (5'-CCTACCCAACCTT-CCTGTTTGTGACCTGTGGGAGACTAGATTTAG-3') and CD209-105mutAS (5'-CTAAATCTAGTCTCCACAGGTCGACA-AACAGGAAGTTGGGTAGG-3'), and the resulting plasmid was termed pCD209-468-105MUT.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)—Nuclear extracts were prepared according to Schreiber *et al.* (30), and EMSA was performed as described (31, 32). Unlabeled competitor oligonucleotides were added to the nuclear extracts at a 100-fold molar excess and incubated at 4 °C for 15 min before the addition of the radioactive probe. In inhibition/

supershift experiments, 1 μ l of anti-human PU.1 polyclonal antiserum (reference or origin) was incubated with the nuclear extract before the addition of the probe. Oligonucleotide probes used for EMSA were DC-SIGN-1 (5'-GTGGGAGACTAGATTTAGGAAGTAAAGA-3', spanning the DC-SIGN promoter between -94 and -67) and DC-SIGN-2 (5'-TACCCAACCTTCTGTTTCTTTCTGTGGGAGAC-T-3', based on the DC-SIGN promoter sequence -119/-85). Double-stranded oligonucleotides used as competitors included DC-SIGN-1, DC-SIGN-2, and DC-SIGN2mut (5'-GGATGACAGATCCCTACCC-GTCGACCTGTTTCTTTCTGTGGG-3'), which includes the DC-SIGN promoter sequence between -119 and -85 mutated at the PU.1-111 binding site.

Western Blot—Cell lysates were obtained in 50 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM Pefabloc, and 2 μ g/ml aprotinin, antipain, leupeptin, and pepstatin. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared according to Schreiber *et al.* (30). 10 μ g of cell lysates was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). After blocking of the unoccupied sites with 5% nonfat dry milk in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, protein detection was performed using the Supersignal West Pico Chemiluminescent system (Pierce). For reprobing, membranes were incubated in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, 100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS) for 30 min at 50 °C with occasional agitation. Detection of PU.1 was carried out using specific affinity-purified rabbit polyclonal antibody (sc-352; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). DC-SIGN was detected using a polyclonal antiserum raised against the 23-residue repeats within the neck region of the molecule (10).

Flow Cytometry and Antibodies—Phenotypic analysis was carried out by indirect immunofluorescence, using unlabeled primary monoclonal antibodies followed by incubation with fluorescein isothiocyanate-labeled Fab goat anti-mouse IgG. Monoclonal antibodies included HB1/5 (anti-CD83, Immunotech, Marseille, France), MR1 (anti-DC-SIGN, CD209), and Bear-2 (anti-CD14). All incubations were done in the presence of 50 μ g/ml human IgG to prevent binding through the Fc portion of the antibodies. The supernatant from the myeloma P3X63Ag8 (X63) was always included as negative control. Flow cytometry analysis was performed with an EPICS-CS (Coulter Cientifica, Madrid, Spain) using log amplifiers.

Chromatin Immunoprecipitation—Chromatin immunoprecipitation assays were performed using the chromatin immunoprecipitation assay kit (Upstate Biotechnology, Inc., Charlottesville, VA) following the manufacturer's instructions. MDDC cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 5 min at 37 °C. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed in 200 μ l of a solution containing 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, and including 1 μ g/ml aprotinin, leupeptin, and pepstatin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Chromatin samples were sonicated with four sets of 10-s pulses at 30% maximum power in a Sonifier S-150D to reduce DNA length to ~200–600 bp. Sonicated lysates were then diluted to 2 ml with 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 20 μ l of this solution were removed for later PCR analysis (input). After preclearing with salmon sperm DNA/Protein A-agarose for 1 h at 4 °C, antibodies (2 μ g) were added, and the sonicated lysates were incubated overnight at 4 °C in a rocking platform. Immune complexes were collected with 60 μ l of salmon sperm DNA/Protein A-agarose (1 h at 4 °C), and agarose beads were washed with solutions of increasing ionic strength. After a final wash in 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, bound immune complexes were eluted in a freshly prepared solution of 1% SDS, 0.1 M

NaHCO₃, and cross-links were reversed in the samples (and the input from the sonicated lysates) by heating at 65 °C for 4 h. Samples were then treated with Proteinase K, and DNA was phenol/chloroform-extracted and precipitated. DNA was resuspended (20 μ l), and 2 μ l was used for detection of the DC-SIGN promoter by PCR using the oligonucleotides 5'-TGCCTACCCTTGCCCTAGTGGGA-3' and 5'-TGGAGTCACTCATGTACCCCCAC-3', which together amplify 353 bp spanning from -340 to +13. DNA from the input was resuspended in 20 μ l, and 2 μ l was used for PCR. Immunoprecipitating antibodies included affinity-purified rabbit polyclonal antibody against human PU.1 (sc-352; Santa Cruz Biotechnology) and purified polyclonal rabbit IgG as a control. As a positive control, amplification of the CD68 promoter was achieved with oligonucleotides 5'-CAACTGCCCTAG-GACTCCGTTTG-3' and 5'-TCAGCCTCCTTCCTCCTTACCT-3', which together amplify a 318-bp region (33).

Gene Expression Profiling in Dendritic Cells—RNAs from immature and lipopolysaccharide-matured MDDC from two independent donors were labeled, processed, and independently hybridized on Codelink human whole genome DNA chip of the Codelink microarray platform (Amersham Biosciences), containing 55,000 human gene targets. For one of the donors, three replicates were independently hybridized. Scanned images were processed using the Codelink Expression Analysis software. Raw data were normalized by the quantile method. Data corresponding to the experimental groups (immature MDDC versus mature MDDC) was analyzed by Student's *t* test. The raw *p* values obtained were adjusted using the control of the false discovery rate-based procedure developed by Benjamini and Yekutieli (34) and implemented in the multitest package within the Bioconductor set of routines (available on the World Wide Web at www.bioconductor.org). Those genes with adjusted *p* values lower than 0.01 and greater than 2-fold differences in both donors were considered as differentially expressed.

RESULTS

Tissue-specific Activity of the DC-SIGN Promoter—Besides MDDC and $\Delta\Delta M\Phi$ (6–10), DC-SIGN expression can be seen on THP-1 myeloid cells but not on lymphoid or erythroleukemic cell lines like Jurkat or K562 cells (10, 35) (Fig. 1, A and B). To analyze the DNA elements and transcription factors that direct the expression of DC-SIGN, we amplified by PCR a genomic region of the DC-SIGN gene (-1656/-19) where, in agreement with a previous report (36), preliminary 5'-rapid amplification of cDNA ends experiments mapped the DC-SIGN transcriptional start sites (data not shown). Sequencing the amplified region revealed its complete identity to the genomic region upstream of the structural region of the DC-SIGN gene that had been determined previously in the contig sequence AC008812.7.1.143619 within the *Ensembl* data base. Based on the sequence and the presence of numerous repetitive sequences in the distal region, two additional deletion constructs were generated, which span the regions -1275/-19 and -468/-19 to dissect the functional activity of the DC-SIGN promoter (Fig. 1C). To determine whether the DC-SIGN regulatory region exhibited differential activity in DC-SIGN+ and DC-SIGN- cells, its activity was assayed in myeloid THP-1, erythroleukemic K562, and lymphoid T Jurkat cell lines. The three DC-SIGN promoter-based constructs exhibited considerably higher activity in THP-1 than in Jurkat or K562 cells, and similar results were obtained when using NIH-3T3 cells (Fig. 1D and not shown). On average, the activity of the pCD209-1600Luc, pCD209-1200Luc, and pCD209-468Luc constructs was 75-, 140-, and 160-fold higher in the DC-SIGN+ THP-1 cell line than in nonexpressing cells (Fig. 1D). Therefore, it can be concluded that the DC-SIGN proximal promoter displays cell-specific activity and exhibits a higher activity in myeloid cells with constitutive expression of DC-SIGN and

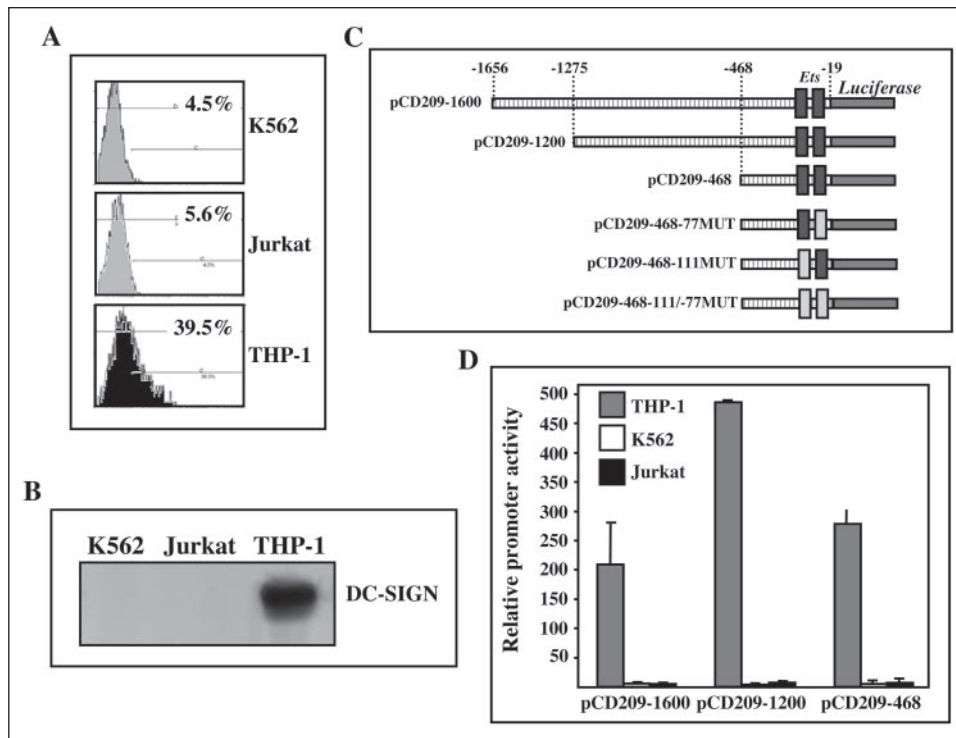


FIGURE 1. Restricted expression of DC-SIGN and cell-specific activity of the DC-SIGN promoter. *A*, cell surface expression of DC-SIGN on THP-1, Jurkat, and K562 cell lines. Flow cytometry was performed using the MR-1 anti-DC-SIGN monoclonal antibody (4). *B*, determination of DC-SIGN expression in THP-1, Jurkat, and K562 cell lines by Western blot, using a polyclonal antiserum against the neck region of the molecule. *C*, schematic representation of the proximal regulatory region of the DC-SIGN gene and reporter plasmids used for its functional dissection. *D*, the DC-SIGN promoter-based constructs pCD209-1600, pCD209-1200 and pCD209-468 were transfected in THP-1 (DC-SIGN+), Jurkat (DC-SIGN-), and K562 (DC-SIGN-). After 48 h, cells were lysed, and luciferase activity was determined. In all cases, the pCMV- β gal plasmid was cotransfected with the luciferase reporter constructs, and transfection efficiencies were normalized according to the β -galactosidase levels. Data represent mean \pm S.D. of four independent experiments using two different DNA preparations.

that most of the tissue-specific activity is retained in the proximal region of the promoter -468/-19.

PU.1 Binds the DC-SIGN Promoter *In Vitro* and *In Vivo*—Initial gel shift assays on oligonucleotides spanning the -468/-19 and software-assisted prediction of transcription factor binding sites revealed the presence of the sequences 5'-CCCAACTTCCTGTTTC-3' and 5'-AG-ATTTGGAAGTAAAG-3' at -111 and -77, respectively, both containing the core recognition motif of the Ets family of transcription factors (Fig. 1C). The pattern of EMSA retarded complexes on oligonucleotides based on these sequences (oligonucleotide probes DC-SIGN-1 and DC-SIGN-2) revealed that they were specifically recognized by nuclear extracts from THP-1 and monocyte-derived dendritic cells but not by K562 cells (Fig. 2A). Moreover, the pattern of retarded complexes on both probes was similar, if not identical, suggesting that they were recognized by a common factor. The pattern of retarded complexes, their cell distribution, and the presence of the GGAA sequence led us to hypothesize that both elements were recognized by the PU.1 transcription factor. As shown in Fig. 2B, the integrity of the GGAA sequence within both oligonucleotides was absolutely required for complex formation. The demonstration that PU.1 binds both elements at the DC-SIGN promoter was obtained through the use of nuclear extracts from PU.1-transfected COS-7 cells and an anti-PU.1 polyclonal antiserum; the mobility of the major retarded complex was identical in PU.1-transfected cells, THP-1 and monocyte-derived dendritic cells, and, more importantly, the complexes were inhibited and supershifted in the presence of the anti-PU.1 polyclonal antiserum (Fig. 2B). The mutation introduced at the distal PU.1 element also affected the formation of a slow mobility complex whose formation was dependent on Sp1 (Fig. 2B). However, the ability of Sp1 to transactivate the DC-SIGN promoter was not affected by such a mutation (see below). Altogether, these

results demonstrate that the PU.1 transcription factor interacts with two sequences within the proximal regulatory region of the DC-SIGN gene, one of which is located adjacent to an Sp1-binding site.

To confirm that PU.1 interacts with the proximal region of the DC-SIGN promoter, we performed chromatin immunoprecipitation with an anti-PU.1 antibody on human monocyte-derived dendritic cells, which exhibit a very high level of expression of DC-SIGN. The proximal DC-SIGN promoter region could be readily amplified from anti-PU.1 immunoprecipitated chromatin, whereas no amplification was obtained in the absence of antibody or in the presence of a control antibody (Fig. 3A). The CD68 promoter, whose occupancy by PU.1 has been previously demonstrated (33), was also amplified from the DNA immunoprecipitated by the anti-PU.1 antiserum (Fig. 3B). Therefore, PU.1 recognizes the proximal promoter of DC-SIGN *in vitro*, and its binding can also be detected *in vivo* by means of chromatin immunoprecipitation.

PU.1 Contributes to the Basal and Tissue-specific Activity of the DC-SIGN Proximal Regulatory Region—The relevance of PU.1 binding to the DC-SIGN promoter was analyzed in two alternative manners. First, the effect of independent mutations at each PU.1-binding site was evaluated in DC-SIGN+ and DC-SIGN- cells in the context of the -468/-19 region of the promoter. Mutation of the distal PU.1-binding element led to a dramatic reduction (only 5% of the activity of the wild type construct) in the DC-SIGN promoter activity, whereas disruption of the proximal PU.1 element reduced promoter activity by half (Fig. 4A). Moreover, the simultaneous mutation of the PU.1-binding elements at -111 and -77 resulted in a dramatic and very significant ($p < 10^{-5}$) reduction of the DC-SIGN promoter activity (Fig. 4B), implying that both sites contribute to the basal activity of the DC-SIGN promoter. The reduction in activity caused by mutation of each PU.1-binding site

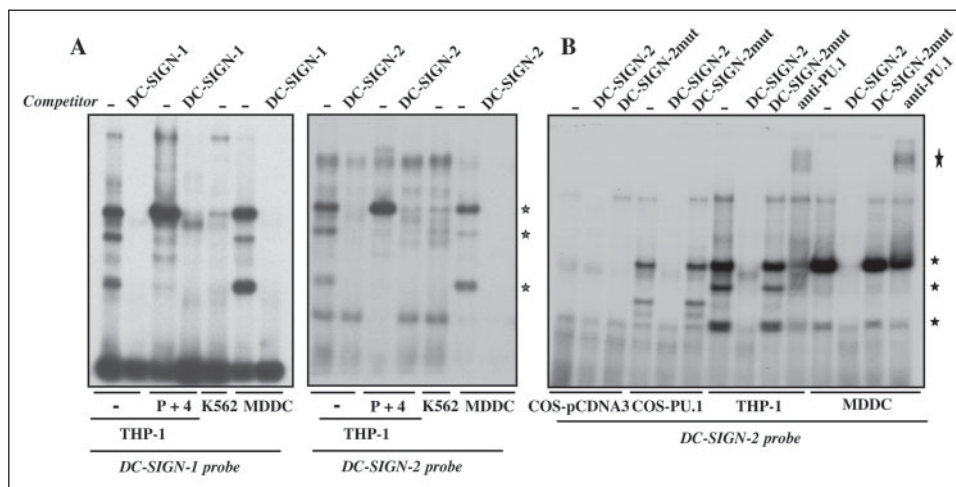


FIGURE 2. Nuclear factors interacting with the DC-SIGN-1 and DC-SIGN-2 oligonucleotide probes and identification of specific nucleotides involved. A, EMSA was performed on the DC-SIGN-1 (left panel) and DC-SIGN-2 (right panel) oligonucleotides using nuclear extracts from K562 cells, immature MDDC, and THP-1 cells untreated or differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate + IL-4 ($p + 4$). The position of the major retarded species is indicated. Where indicated, unlabeled competitor oligonucleotides were added at a 100-fold molar excess. B, EMSA was performed on the DC-SIGN-2 oligonucleotide using nuclear extracts from THP-1 cells, immature MDDC or COS-7 cells transfected with an empty pCDNA3.1(-) expression vector or with the human PU.1 expression vector pCDNA3.1-PU.1, and in the absence or presence of the indicated competitor oligonucleotides at a 100-fold molar excess or an anti-PU.1 polyclonal antiserum. The positions of PU.1-containing complexes and the anti-PU.1-supershifted complex are indicated.

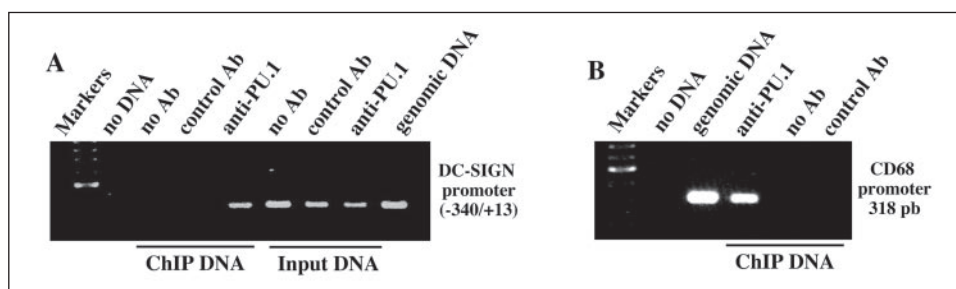


FIGURE 3. *In vivo* occupancy of the DC-SIGN proximal promoter by PU.1. Shown are chromatin immunoprecipitations on immature monocyte-derived dendritic cells using an affinity-purified polyclonal antiserum specific for PU.1, a nonspecific affinity-purified antiserum (*control Ab*), or no antibody. Immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using a pair of DC-SIGN promoter-specific primers that amplify a 353-bp fragment flanking the PU.1-binding sites at -111 and -77 (A) or primers specific for detection of the CD68 promoter (B). *Input lanes* represent the PCR analysis performed on DNA from a 1:20 dilution of the starting sonicated lysate. Each experiment was performed twice with similar results, and one of the experiments is shown.

was higher in DC-SIGN+ (THP-1) than in DC-SIGN- cells (Fig. 4A), indicating that both sites contribute to the tissue-specific activity of the promoter. As a control, mutation of the sequences at -105, predicted to be recognized by members of the IRF family, had a weaker effect in DC-SIGN+ cells.

Second, the ability of PU.1 to transactivate the DC-SIGN promoter was determined in cells devoid of PU.1 expression (NIH-3T3). PU.1 was capable of transactivating, weakly but significantly, the DC-SIGN promoter when the reporter construct was co-transfected with a PU.1 expression vector (Fig. 4C), and the transactivating effect was reduced by either independent or simultaneous mutation of both PU.1-binding sites (Fig. 4C). Altogether, this set of results demonstrates that occupancy of the PU-1 binding sites contributes to both the basal and tissue-specific activity of the DC-SIGN promoter.

PU.1 Transactivates the DC-SIGN Proximal Regulatory Region in Collaboration with Other Myeloid Transcription Factors—To determine whether other myeloid factors play a role in the activity of the DC-SIGN promoter, we evaluated the influence of Myb and RUNX factors in transactivation experiments, since both are expressed in myeloid cells and have been previously reported to collaborate with PU.1 (37, 38). Preliminary experiments in K562 cells revealed that the DC-SIGN promoter was transactivated by RUNX1 (8–20-fold), RUNX3 (3–15-fold), and Myb (2-fold), and that mutation of each PU.1-binding element did not reduce RUNX-mediated transactivation (Fig. 5A; data not shown). However, the influence of the three factors was consider-

ably weaker in NIH-3T3 cells, suggesting a cell type-specific effect (Fig. 5, B and C). Therefore, PU.1 was transiently cotransfected with either Myb or RUNX3 in NIH-3T3 cells to evaluate their combined effect on the DC-SIGN promoter. Co-expression of PU.1 with either RUNX3 or c-Myb considerably enhanced the activity of the DC-SIGN promoter (Fig. 5, B and C). Moreover, the activity of the DC-SIGN promoter in the presence of PU.1 and either c-Myb or RUNX3 was higher than the activity exhibited in the presence of each individual factor (Fig. 5, B and C). These results demonstrate that the transactivation ability of PU.1 on the DC-SIGN promoter is enhanced in the presence of either Myb or RUNX3 and indicate that PU.1 synergizes with Myb or RUNX3 in transactivation of the DC-SIGN promoter. Interestingly, mutation of the distal PU.1-binding site had a minor effect on the PU.1/RUNX3 or PU.1/Myb collaboration, whereas mutation of the PU.1 element at -77 resulted in an almost complete loss of the collaborative effect (Fig. 5, B and C). Therefore, it can be concluded that the PU.1-binding sites within the DC-SIGN promoter mediate the transactivation ability of PU.1 and that the proximal PU.1-binding site at -77 mediates most of its responsiveness to the collaborative action of PU.1 and either c-Myb or RUNX3.

PU.1 Expression Correlates with DC-SIGN Cell Surface Expression in Monocyte-derived Macrophages and Dendritic Cells and Influences DC-SIGN Expression in THP-1 Cells—The dependence of the DC-SIGN promoter functional activity on the occupancy of the two PU.1-binding sites led us to explore whether a correlation existed between the expression of PU.1 and that of DC-

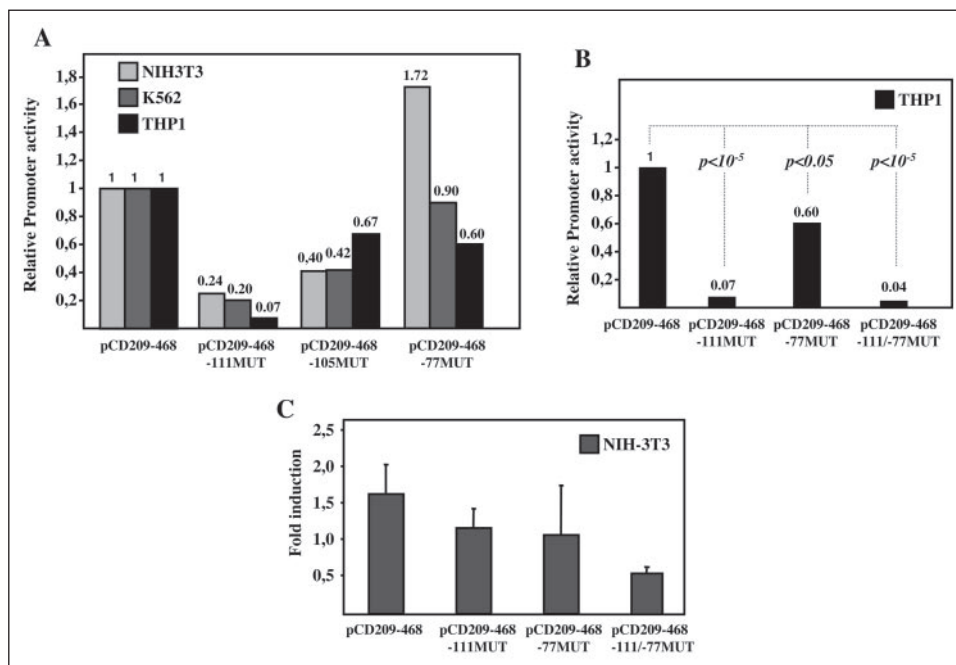


FIGURE 4. The basal and cell-specific activity of the DC-SIGN promoter is dependent on the -111/-108 and -77/-74 PU.1-binding elements. A, THP-1, K562, and NIH-3T3 cells were transfected with the indicated reporter plasmids, and luciferase activity was determined after 24 h. Promoter activity is expressed relative to the activity produced by the wild-type pCD209-468 reporter plasmid in each transfected cell type after normalization for transfection efficiency. Each experiment was performed three times with two distinct DNA preparations, and a representative experiment is shown. B, THP-1 were transfected with the indicated reporter plasmids, and luciferase activity was determined after 24 h. Promoter activity is expressed relative to the activity produced by the wild-type pCD209-468 reporter plasmid after normalization for transfection efficiency. Data represent mean \pm S.D. of triplicate determinations with two different DNA preparations ($p < 10^{-5}$ for pCD209-468-111MUT and pCD209-468-111/-77MUT and $p < 0.05$ for pCD209-468-77MUT, when compared with the activity of the wild-type construct). C, NIH-3T3 cells were transfected with the indicated reporter plasmids together with 50 ng of either CMV-0 (empty) or pCDNA3-PU.1 expression plasmids. -Fold induction represents the luciferase activity produced by the pCDNA3-PU.1 expression vector relative to the activity produced by CMV-0. Data represent mean \pm S.D. of three independent experiments using two different DNA preparations.

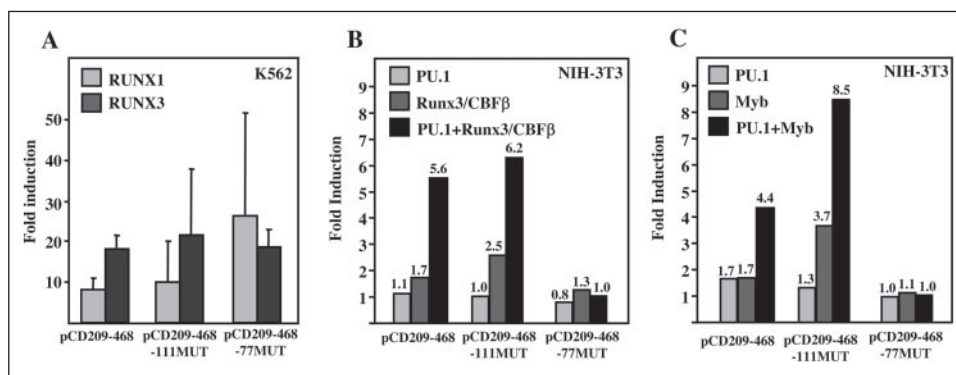


FIGURE 5. The proximal PU.1-binding site within the DC-SIGN gene promoter confers responsiveness to RUNX and c-Myb. A, K562 cells were transfected with the indicated reporter plasmids in the presence of CMV-0, CMV-RUNX1, or CMV-RUNX3, and luciferase activity was determined after 24 h. For each individual reporter construct, -fold induction represents the luciferase activity yielded by an expression vector relative to the activity produced by a similar amount of empty CMV-0 plasmid. Data represent mean \pm S.D. of three independent experiments using two different DNA preparations. B and C, NIH-3T3 cells were transfected with the indicated reporter plasmids and either pCDNA3-PU.1 or CMV-RUNX3 + pCDM8-CBFβ (B) or CMV-Myb (C) or pCDNA3-PU.1 together with either CMV-RUNX3 + pCDM8-CBFβ (B) or CMV-Myb (C). In all cases, total DNA was kept constant (1.5 μ g) by adding CMV-0 plasmid DNA, and luciferase activity was determined after 24 h. For each individual reporter construct, -fold induction represents the luciferase activity yielded by an expression vector combination relative to the activity produced by a similar amount of empty CMV-0 plasmid. Data represent mean \pm S.D. of three independent experiments using two different DNA preparations.

SIGN. Analysis of PU.1 expression in MDDC from two independent donors, where DC-SIGN expression is most prominent (Fig. 6A), indicated the presence of high levels of PU.1 in the nuclei of dendritic cells (Fig. 6B) and revealed that down-regulation of DC-SIGN during MDDC maturation (Fig. 6A) coincided with a considerably decrease in the nuclear content of PU.1 (Fig. 6B). The correlation between the expression of DC-SIGN and PU.1 was not only observed in MDDC maturation but also upon macrophage activation, since nuclear PU.1 was considerably higher in AAMΦ, for which DC-SIGN is a cell surface marker (10), than in CAMΦ (Fig. 6C). Finally, to determine whether DC-SIGN and PU.1 RNA levels also correlated during dendritic cell maturation, microarray gene profiling experiments were performed on immature and mature MDDC. In agreement with their diminished protein expression in

mature MDDC, DC-SIGN and PU.1 RNA were down-regulated to a similar extent during MDDC maturation (between 5 and 8 times in two independent donors, with $p < 10^{-4}$ for PU.1 mRNA and $p < 0.006$ for DC-SIGN mRNA), whereas the mRNA for the maturation marker CD83 was greatly increased ($p < 10^{-6}$) (Fig. 6D). Therefore, and in agreement with the functional relevance of its occupancy of the DC-SIGN promoter, PU.1 expression parallels that of DC-SIGN in activating macrophages and maturing dendritic cells, further suggesting that PU.1 critically contributes to DC-SIGN promoter activity and cell surface expression.

The comparison of AAMΦ and CAMΦ led us to test whether IL-4 was responsible for the differential expression of PU.1 in both cell types. To that end, monocytes and monocyte-derived macrophages (gener-

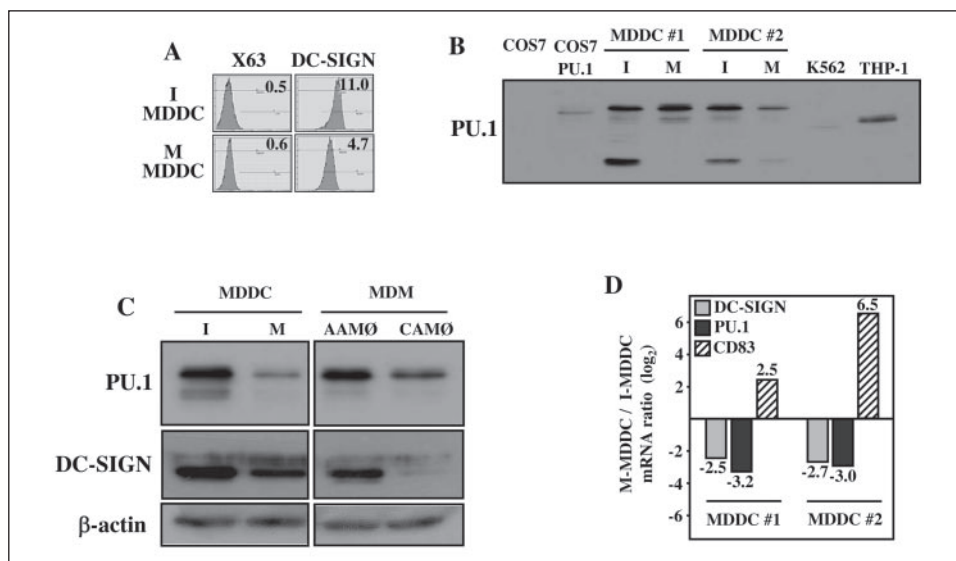


FIGURE 6. Correlation between PU.1 expression and DC-SIGN cell surface levels in dendritic cells and macrophages. *A*, cell surface expression of DC-SIGN on immature and lipopolysaccharide-mature monocyte-derived dendritic cells. Flow cytometry was performed using the MR-1 anti-DC-SIGN monoclonal antibody (4) and the supernatant of the murine myeloma P3X63Ag8 as control. *B*, whole cell extracts were obtained from THP-1, K562, immature (*I*), and mature (*M*) MDDC from two independent donors and untransfected or pCDNA3-PU.1-transfected COS-7 cells, and 10 μ g of each extract was subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1 (sc-352; Santa Cruz Biotechnology). *C*, whole cell extracts were obtained from MDDC (immature (*I*) and mature (*M*)) and MDM treated for 48 h with either IL-4 (*AAMØ*) or interferon- γ (*CAMØ*), and 10 μ g of each extract was subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1, DC-SIGN (10), or β -actin as control. *D*, determination of the mRNA level for PU.1 and DC-SIGN in immature and mature MDDC from two independent donors using the human whole genome DNA chip of the Codelink microarray platform. Data shown represent the mature MDDC/immature MDDC mRNA ratio for PU.1 and DC-SIGN, in a log₂ scale. The CD83 mRNA -fold change is also represented as control for MDDC maturation.

ated with either granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor) were treated with IL-4, and the expression levels of PU.1 were determined by Western blot. As shown in Fig. 7, PU.1 expression was considerably increased in both monocytes (Fig. 7*A*) and monocyte-derived macrophages (Fig. 7*B*), regardless of the cytokine used for macrophage differentiation. As expected, DC-SIGN expression was higher in IL-4-treated monocytes and macrophages, which exhibit higher levels of PU.1 (Fig. 7, *A* and *B*). This set of experiments further confirms the correlation between PU.1 and DC-SIGN expression in myeloid cells and indicates that PU.1 expression is regulated by IL-4 in both monocytes and macrophages.

Finally, to definitively establish the influence of PU.1 on DC-SIGN cell surface expression, DC-SIGN RNA and protein levels were determined in THP-1 cells nucleofected with a PU.1-specific siRNA. Transfection of PU.1-siRNA in THP-1 cells led to a 70% reduction in the levels of PU.1 protein, as determined by Western blot on whole cell extracts (Fig. 7*C*). More importantly, reverse transcription-PCR and Western blot revealed that DC-SIGN RNA and protein levels were significantly lower in the PU.1-siRNA-transfected cells than in cells transfected with a control siRNA (Fig. 7, *C* and *D*). Therefore, diminishing PU.1 expression has a direct impact on DC-SIGN RNA and protein levels, confirming the relevance of PU.1 for DC-SIGN gene expression.

DISCUSSION

DC-SIGN is a cell surface molecule involved in intercellular adhesion and antigen uptake whose function is subverted by numerous pathogens in their strategy to evade immunosurveillance (1, 39) and whose expression is restricted to myeloid dendritic cells and certain macrophages (6–10). In the present report, we present evidence that the PU.1 transcription factor is involved in the basal and tissue-specific expression of DC-SIGN through occupancy of two DNA elements within the proximal regulatory region of the DC-SIGN gene. The integrity of the proximal PU.1-binding site is not only required for PU.1 responsiveness but also mediates the transactivating effects of Myb and RUNX3 on the DC-SIGN proximal regulatory region. Moreover, the expression of DC-SIGN correlates with PU.1 nuclear levels during dendritic cell maturation

and upon alternative and classical macrophage activation, and reduction of PU.1 expression through siRNA results in diminished cellular DC-SIGN level. Altogether, these results demonstrate a critical role for PU.1 in DC-SIGN gene expression.

The involvement of PU.1 in the cell-specific expression of DC-SIGN is in line with the known functions of PU.1 in myeloid cell differentiation. The analysis of PU.1-deficient mice revealed that PU.1 is required for the proper development of myeloid progenitors and for the generation of myeloid-derived (26) and thymic (27) dendritic cells. In addition, the PU.1-interacting factor ICSBP (interferon consensus sequence-binding protein) is critical for both early differentiation and final maturation of dendritic cells (40). In the human system, PU.1 is also implicated in the generation of Langerhans cells, since its expression in myeloid progenitors triggers Langerhans cell development, and factors that inhibit PU.1 function prevent Langerhans cell generation (28). Since DC-SIGN mediates relevant effector functions in dendritic cells (antigen uptake and interaction with endothelial and T cells), it is tempting to speculate that an altered expression of DC-SIGN might contribute to the altered dendritic cell generation seen in the absence of PU.1. However, and despite its relevance for DC-SIGN promoter activity, PU.1 is required but is not sufficient for DC-SIGN expression, since PU.1+ B lymphocytes are devoid of DC-SIGN expression, and monocyte-derived macrophages exhibit moderate levels of PU.1 but low/absent levels of DC-SIGN. In this regard, other myeloid-specific factors, in combination with PU.1, might ultimately determine the cell- and state-specific expression of DC-SIGN. Besides recognition by PU.1, the proximal Ets element also confers RUNX3 responsiveness to the DC-SIGN proximal promoter in a PU.1-dependent manner. The participation of RUNX3 in the regulation of DC-SIGN expression would be in agreement with the ability of RUNX3 to modulate the phenotypic and functional maturation of dendritic cells, since bone marrow-derived murine dendritic cells from RUNX3 $-/-$ exhibit accelerated maturation (41). In any event, given the down-regulation of PU.1 (this paper) and the up-regulation of RUNX3 upon dendritic cell maturation (42), it is tempting to speculate that RUNX3 might negatively regulate DC-SIGN

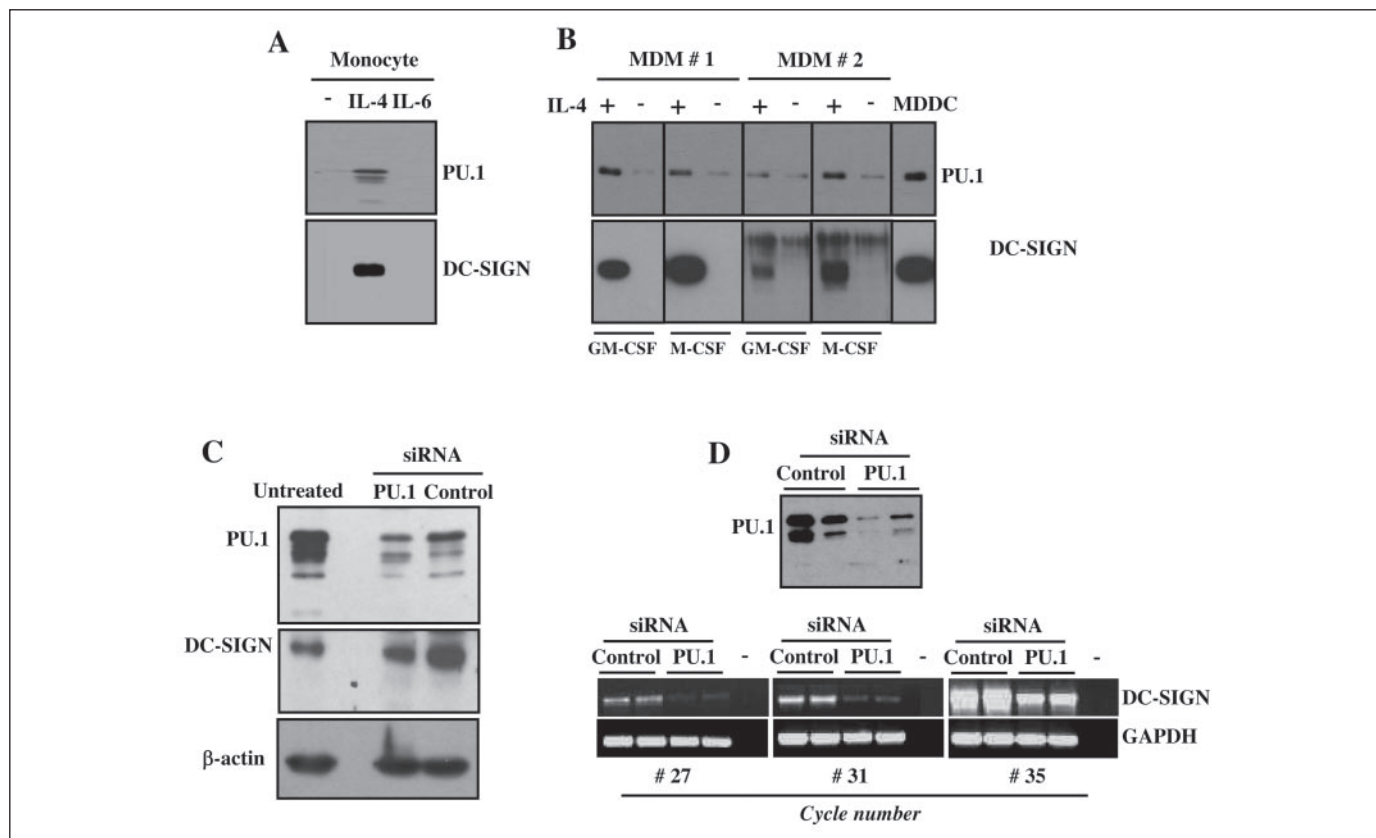


FIGURE 7. IL-4-regulated expression of PU.1 and DC-SIGN in monocytes and macrophages, and influence of PU.1 on DC-SIGN expression level. *A*, whole cell extracts were obtained from untreated monocytes (–) or monocytes treated with either IL-4 or -6 for 24 h, and 10 μ g of each whole cell extract was subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1 or DC-SIGN (10). *B*, whole cell extracts were obtained from untreated or IL-4-treated MDM generated with either granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor from two independent donors (MDM#1 and MDM#2). 10 μ g of each extract was subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1 or DC-SIGN (10). Whole cell extracts from MDDC were analyzed in parallel as control. *C*, 2×10^6 THP-1 cells was transfected by nucleofection with 3 μ g of siRNA for PU.1 (PU.1) or a control siRNA using the Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa). After 24 h, half of the cells were lysed, and cell lysates were subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1, DC-SIGN (10), or β -actin as control. 10 μ g of a lysate from untransfected THP-1 cells (lanes labeled *Untreated*) was analyzed in parallel to mark the positions of the PU.1, DC-SIGN, and β -actin bands and to serve as a reference for antibody specificity. The experiment was performed twice with similar results, and one of the experiments is shown. *D*, 2×10^6 THP-1 cells was transfected by nucleofection with 3 μ g of siRNA for PU.1 (PU.1) or a control siRNA using the Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa). After 24 h, one-fifth of the cells were lysed, and cell lysates were subjected to Western blot using a polyclonal antiserum specific for human PU.1 (upper panel). RNA from the remaining siRNA-transfected cells was subjected to reverse transcription-PCR for the indicated cycles to specifically amplify the whole coding region of the DC-SIGN RNA (lower left panels) or a 417-bp fragment from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA as control. Control PCRs were carried out in the absence of cDNA (lanes labeled with a minus sign). Two independent experiments were performed, and both of them are shown.

expression in dendritic cells, an explanation compatible with the context-dependent transcriptional regulatory activity of RUNX factors (43).

Reverse transcription-PCR experiments have led to the identification of five murine molecules with homology to DC-SIGN (mDC-SIGN and SIGNR1 to -4) (44). Their degree of identity to human DC-SIGN in the lectin domain ranges from 65 to 70%, but all of them exhibit considerably shorter neck domains weakly homologous to that of human DC-SIGN (44). Based on its genomic location and the high level of mRNA in murine CD11+ dendritic cells, one of the molecules has been termed mDC-SIGN, whose mRNA can be detected also in B cells and even spleen T lymphocytes (44). However, comparison of upstream genomic sequences reveals that the sequence around position -111, whose disruption critically affects the activity of the human DC-SIGN promoter (Fig. 4A), is conserved in the putative regulatory regions of SIGNR1, SIGNR3, and SIGNR4, whereas the proximal PU.1-binding site at -77 is maintained within the SIGNR3 and SIGNR4 genes, and none of them is conserved in the mDC-SIGN gene (data not shown). A more extensive analysis of the pattern of expression of all of the DC-SIGN murine homologues is required to evaluate the functional significance that the conservation or loss of these elements might have.

Together with other C-type lectins on the surface of dendritic cells, DC-SIGN appears as a key player in the initial stages of HIV infection through its ability to capture and transfer virus to T lymphocytes (45).

DC-SIGN is found in both peripheral blood dendritic cell precursors and mucosal dendritic cells and is therefore adequately positioned for HIV spread both after sexual transmission and after contamination with blood. The participation of DC-SIGN in HIV infection has prompted studies to identify either DC-SIGN variants or polymorphisms that correlate with reduced or increased risk of HIV-1 infection. Heterozygosity of a DC-SIGN variant affecting the “neck” domain has been proposed to reduce the risk of HIV-1 infection (46), whereas a large study on the European-American population at risk for HIV infection has revealed that a single-nucleotide polymorphism in the DC-SIGN promoter associates with an increased risk for parenteral HIV-1 infection (19). This polymorphism affects a nucleotide included within the -468/-19 region and is located upstream of the PU.1-binding sites identified in the present study. The functional relevance of this polymorphism in terms of promoter activity has not been evaluated (19), and it will be interesting to determine the identity of the factors binding to this DNA element as well as their potential cooperation with PU.1 for DC-SIGN gene transcription.

A large battery of receptors are used by phagocytes to recognize both foreign invaders and endogenously produced molecules (47). These receptors include Toll-like receptors, scavenger receptors, complement and Fc receptors, integrins, and members of the C-type lectin receptor family, most of which have evolved to recognize conserved motifs on

pathogens that are not found on higher eukaryotes (47). The down-regulation of PU.1 upon dendritic cell maturation suggests that the factor has a more relevant role in the effector functions displayed by immature dendritic cells, whose more characteristic ability is the binding and uptake of extracellular material for subsequent antigen presentation. In this regard, the participation of PU.1 in DC-SIGN expression is in line with previous reports describing the ability of PU.1 to regulate the transcription of genes encoding receptors involved in pathogen recognition and antigen uptake such as Toll-like receptor 4 (48), the scavenger receptor CD68 (49), the integrins CD11c and CD11b (32, 50), and the macrophage mannose receptor (51, 52). Therefore, the involvement of PU.1 in DC-SIGN expression can be framed within the contribution that PU.1 appears to have to the acquisition of the antigen uptake molecular repertoire in dendritic cells and macrophages.

On the other hand, the higher level of PU.1 in AAM Φ , as compared with interferon- γ -treated macrophages, and its up-regulation by IL-4 suggest that PU.1 might be preferentially expressed during Th2 immune responses. The involvement of PU.1 in the IL-4-induced expression of arginase I in macrophages (53) further supports this hypothesis, since elevated arginase I expression is characteristic of AAM Φ and is responsible for their lack of NO production and reduced microbicidal function (54). The implication of PU.1 in the IL-4-induced expression of the AAM Φ -specific markers DC-SIGN and arginase I is consistent with the relative levels of PU.1 that we have observed in AAM Φ and CAM Φ . Based on these observations, the involvement of PU.1 in the acquisition of other AAM Φ -specific effector functions (promotion of tumor cell growth and wound repair, proangiogenic activity, extracellular matrix deposition) is a matter that deserves further investigation.

REFERENCES

- Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Engering, A., Hart, B. A., and van Kooyk, Y. (2004) *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 33–54
- Curtis, B. M., Scharnowski, S., and Watson, A. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8356–8360
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000) *Cell* **100**, 575–585
- Relloso, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Rodriguez-Fernandez, J. L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Munoz-Fernandez, M. A., Sanchez-Mateos, P., and Corbi, A. L. (2002) *J. Immunol.* **168**, 2634–2643
- Chehimi, J., Luo, Q., Azzoni, L., Shawver, L., Ngoubilly, N., June, R., Jerandi, G., Farbaugh, M., and Montaner, L. J. (2003) *J. Leukocyte Biol.* **74**, 757–763
- van Lent, P. L., Figdor, C. G., Barrera, P., van Ginkel, K., Sloetjes, A., van den Berg, W. B., and Torensma, R. (2003) *Arthritis Rheum.* **48**, 360–369
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L. J., Doms, R. W., Weissman, D., Coleman, N., and Lee, B. (2002) *J. Leukocyte Biol.* **71**, 445–457
- Engering, A., van Vliet, S. J., Hebeda, K., Jackson, D. G., Prevo, R., Singh, S. K., Geijtenbeek, T. B., van Krieken, H., and van Kooyk, Y. (2004) *Am. J. Pathol.* **164**, 1587–1595
- Engering, A., Van Vliet, S. J., Geijtenbeek, T. B., and Van Kooyk, Y. (2002) *Blood* **100**, 1780–1786
- Puig-Kroger, A., Serrano-Gomez, D., Caparros, E., Dominguez-Soto, A., Relloso, M., Colmenares, M., Martinez-Munoz, L., Longo, N., Sanchez-Sanchez, N., Rincon, M., Rivas, L., Sanchez-Mateos, P., Fernandez-Ruiz, E., and Corbi, A. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 25680–25688
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., and van Kooyk, Y. (2002) *J. Immunol.* **168**, 2118–2126
- Schjetne, K. W., Thompson, K. M., Aarvak, T., Fleckenstein, B., Sollid, L. M., and Bogen, B. (2002) *Int. Immunol.* **14**, 1423–1430
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000) *Nat. Immunol.* **1**, 353–357
- Cambi, A., and Figdor, C. G. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 539–546
- Appelmelk, B. J., van Die, I., van Vliet, S. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2003) *J. Immunol.* **170**, 1635–1639
- Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K., and Weis, W. I. (2001) *Science* **294**, 2163–2166
- Frison, N., Taylor, M. E., Soilleux, E., Boussier, M. T., Mayer, R., Monsigny, M., Drickamer, K., and Roche, A. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23922–23929
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000) *Cell* **100**, 587–597
- Martin, M. P., Lederman, M. M., Hutcheson, H. B., Goedert, J. J., Nelson, G. W., van Kooyk, Y., Detels, R., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S. J., and Carington, M. (2004) *J. Virol.* **78**, 14053–14056
- Friedman, A. D. (2002) *Oncogene* **21**, 3377–3390
- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Bevern, C., and Maki, R. A. (1990) *Cell* **61**, 113–124
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994) *Science* **265**, 1573–1577
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996) *EMBO J.* **15**, 5647–5658
- DeKoter, R. P., and Singh, H. (2000) *Science* **288**, 1439–1441
- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J. L., Iwasaki, H., Le Beau, M. M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D. G. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 624–630
- Guerriero, A., Langmuir, P. B., Spain, L. M., and Scott, E. W. (2000) *Blood* **95**, 879–885
- Anderson, K. L., Perkin, H., Surh, C. D., Venturini, S., Maki, R. A., and Torbett, B. E. (2000) *J. Immunol.* **164**, 1855–1861
- Iwama, A., Osawa, M., Hirasawa, R., Uchiyama, N., Kaneko, S., Onodera, M., Shibuya, K., Shibuya, A., Vinson, C., Tenen, D. G., and Nakauchi, H. (2002) *J. Exp. Med.* **195**, 547–558
- Nordeen, S. K. (1988) *BioTechniques* **6**, 454–458
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419
- Puig-Kroger, A., Sanchez-Elsner, T., Ruiz, N., Andreu, E. J., Prosper, F., Jensen, U. B., Gil, J., Erickson, P., Drabkin, H., Groner, Y., and Corbi, A. L. (2003) *Blood* **102**, 3252–3261
- Lopez-Rodriguez, C., and Corbi, A. L. (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 1843–1847
- O'Reilly, D., Quinn, C. M., El-Shanawany, T., Gordon, S., and Greaves, D. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 21909–21919
- Benjamini, Y., and Yekutieli, D. (2001) *Ann. Statist.* **29**, 1165–1188
- Mummidi, S., Catano, G., Lam, L., Hoefle, A., Telles, V., Begum, K., Jimenez, F., Ahuja, S. S., and Ahuja, S. K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33196–33212
- Liu, H., Yu, W., Liou, L. Y., and Rice, A. P. (2003) *Gene (Amst.)* **313**, 149–159
- Oelgeschlager, M., Nuchprayoon, I., Luscher, B., and Friedman, A. D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4717–4725
- Petrovick, M. S., Hiebert, S. W., Friedman, A. D., Hetherington, C. J., Tenen, D. G., and Zhang, D. E. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3915–3925
- van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. B. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 697–709
- Tsujimura, H., Tamura, T., Gongora, C., Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Sher, A., and Ozato, K. (2003) *Blood* **101**, 961–969
- Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S., and Groner, Y. (2004) *EMBO J.* **23**, 969–979
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. (2001) *Science* **294**, 870–875
- Durst, K. L., and Hiebert, S. W. (2004) *Oncogene* **23**, 4220–4224
- Park, C. G., Takahara, K., Umamoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B. E., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2001) *Int. Immunol.* **13**, 1283–1290
- Turville, S. G., Arthos, J., Donald, K. M., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D., and Cunningham, A. L. (2001) *Blood* **98**, 2482–2488
- Liu, H., Hwangbo, Y., Holte, S., Lee, J., Wang, C., Kaupp, N., Zhu, H., Celum, C., Corey, L., McElrath, M. J., and Zhu, T. (2004) *J. Infect. Dis.* **190**, 1055–1058
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. (2002) *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77–84
- Rehli, M., Poltorak, A., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R., and Beutler, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9773–9781
- Li, A. C., Guidez, F. R., Collier, J. G., and Glass, C. K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5389–5399
- Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., Chen, H. M., Galson, D. L., Maki, R. A., and Tenen, D. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5014–5020
- Eichbaum, Q., Heney, D., Raveh, D., Chung, M., Davidson, M., Epstein, J., and Ezekowitz, R. A. (1997) *Blood* **90**, 4135–4143
- Egan, B. S., Lane, K. B., and Shepherd, V. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9098–9107
- Pauleau, A. L., Rutschman, R., Lang, R., Pernis, A., Watowich, S. S., and Murray, P. J. (2004) *J. Immunol.* **172**, 7565–7573
- Gordon, S. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35

DISCUSIÓN

El presente trabajo ha tenido como objetivo global diseccionar la expresión y función de dos de las lectinas codificadas en el *cluster* de genes del cromosoma 19p13.2, DC-SIGN y LSECtin. DC-SIGN ha sido implicada desde su descubrimiento en el reconocimiento de numerosos patógenos, y aunque existe un gran número de publicaciones acerca de su estructura y posible función, se conoce muy poco sobre su regulación transcripcional y el control de su expresión, aspectos que han sido objeto de estudio en esta Tesis. LSECtin ha sido descrita muy recientemente, y dado que aún se desconocen muchos aspectos relativos a su función y expresión, ambos aspectos han sido abordados también durante la presente Tesis.

1.- Regulación de la Expresión de DC-SIGN: estudio de los factores de transcripción que controlan la tejido-especificidad de la expresión de DC-SIGN a nivel transcripcional.

DC-SIGN es una proteína transmembranal implicada en la captación de antígenos y adhesión celular, y cuya función es aprovechada por determinados patógenos en su estrategia para evadir al sistema inmunitario [89, 208]. Aunque inicialmente DC-SIGN se identificó como un marcador fenotípico adquirido durante la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas, su expresión no está restringida a células dendríticas mieloides, y está presente en ciertas poblaciones de macrófagos (alveolares, sinoviales y de nódulo linfático y placenta) [177, 188, 209-212].

El presente trabajo demuestra que el factor de transcripción PU.1 está implicado en la expresión basal y tejido-específica de DC-SIGN a través de la ocupación de dos elementos de DNA situados en la región reguladora proximal del gen de DC-SIGN. La integridad del sitio proximal de unión para PU.1 es requerida no sólo para la respuesta a PU.1, sino también para el efecto transactivador de Myb y RUNX3 sobre el promotor de DC-SIGN. De hecho, la expresión de DC-SIGN correlaciona con los niveles nucleares de PU.1 durante la maduración de células dendríticas y la activación de macrófagos, y la expresión reducida de PU.1 (mediante experimentos con siRNA) tiene como consecuencia una disminución de los niveles celulares de DC-SIGN. Todo ello demuestra un papel crítico de PU.1 en la expresión de DC-SIGN.

PU.1 pertenece a la familia de factores de transcripción Ets y es esencial en el desarrollo de células mieloides y la expresión génica en dicho linaje [213-216]. El gen de PU.1 se identificó por codificar una proteína con capacidad de unión al promotor del gen de MHC clase II I-A β [214]. Su expresión está restringida a células hematopoyéticas, principalmente células B, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, pero no se detecta en células T o eritrocitos [217, 218]. PU.1 se une a elementos de DNA ricos en Purinas (secuencia 5'-GAGGAA-3'), que a

menudo están asociados a sitios de unión para otros factores de transcripción (C/EBP, RUNX,...). La importancia de PU.1 en el desarrollo de células mieloides queda ilustrada por la ausencia de receptores de CSFs en ratones PU.1-/- [219], y su influencia sobre las regiones reguladoras de los genes que codifican M-CSFR, G-CSFR y GM-CSFR, moléculas de adhesión celular (CD11b, CD11c, Cd18, receptor *scavenger*) y componentes del sistema NADPH oxidasa (gp91phox y gp47phox) [213, 220]. Varios estudios han demostrado que los niveles de PU.1 condicionan la diferenciación hematopoyética [221, 222]. En este sentido, bajas concentraciones de PU.1 promueven la diferenciación a células B, mientras que altos niveles de expresión de PU.1 promueven la diferenciación hacia macrófagos [221]. La diferenciación de precursores mieloides hacia macrófagos *versus* neutrófilos también viene determinada por los niveles PU.1, aunque en este proceso también participan los factores C/EBP α , Erg1/2 y Gfi-1 [222, 223]. PU.1 puede ser fosforilarse por PKC, CKII y p38 MAPK en diferentes residuos de serina (Ser 41, Ser 45, Ser 142, Ser 148,...) dependiendo del sistema celular y el estímulo [224-228]. El análisis de ratones deficientes para PU.1 ha demostrado que es imprescindible para el adecuado desarrollo de progenitores mieloides y para la generación de células dendríticas derivadas de monocitos [229] y tímicas [230]. En el sistema humano PU.1 también está implicado en la generación de células de Langerhans, ya que su expresión en progenitores mieloides induce el desarrollo de estas células, y C/EBP α , que inhibe las funciones de PU.1, previene dicho desarrollo [231].

Dado que DC-SIGN media captación antigénica e interacciones con el endotelio y células T, se podría especular que parte de las alteraciones observadas en los ratones deficientes para PU.1 se deben a la ausencia de DC-SIGN. Sin embargo, la presencia de PU.1 no es suficiente para la expresión de DC-SIGN, ya que diferentes poblaciones de macrófagos, neutrófilos y linfocitos B (PU.1⁺) no expresan DC-SIGN. De hecho, en el caso de linfocitos B, ni la presencia de IL-4, citoquina inductora de DC-SIGN [178], es suficiente para promover la expresión de DC-SIGN, que requiere un estímulo adicional como CD40-L [232]. Estos resultados podrían justificarse en caso de que la expresión de DC-SIGN necesitare de un determinado umbral de PU.1, y que IL-4 contribuyese a aumentar los niveles de PU.1. Alternativamente, IL-4 podría activar rutas de señalización y factores de transcripción que colaboren con PU.1 en la inducción de DC-SIGN. En este sentido, tampoco la fosforilación de STAT6 en respuesta a IL-4, junto a la presencia de PU.1, es suficiente para inducir la expresión de DC-SIGN en células THP-1, en las que un aumento significativo de los niveles de expresión de DC-SIGN solamente se consigue en presencia de IL-4 y agentes diferenciadores [180]. Existen, al menos, dos posibles explicaciones para este último caso. Una de ellas es que la expresión de DC-SIGN requiera una parada de la proliferación, y por tanto, la débil expresión de DC-SIGN en THP-1 se explicaría por el porcentaje de células que constitutivamente diferencian durante el cultivo *in vitro*. Alternativamente, es posible que el nivel de PU.1 fosforilado presente en THP-1 sea bajo y que

sea necesario el tratamiento con agentes diferenciadores para incrementar estos niveles [224]. De hecho, se sabe que la fosforilación de PU.1 puede afectar a la unión del factor al DNA [225, 233] y también a su capacidad de interactuar con otros factores de transcripción [227, 228].

Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la existencia de dos elementos de unión para STAT6 en la región promotora de DC-SIGN (datos no publicados). Aunque la presencia de IL-4 y la subsecuente activación de STAT6 en presencia de PU.1 no sean suficientes para inducir la expresión de DC-SIGN, no es descartable que exista una colaboración entre ellos, tal y como ocurre en el promotor de Ige en linfocitos B [234]. Con los resultados mostrados en la presente Tesis, y en la línea de los trabajos ya publicados por otros grupos sobre PU.1, queda patente que PU.1 es necesario para la regulación transcripcional de DC-SIGN, pero requiere de la colaboración de otros factores mieloides, tal y como ocurre con el gen de la elastasa [235], del receptor de GM-CSF [236] y M-CSF [237].

Los factores RUNX son reguladores transcripcionales dependientes de contexto [238] y están también implicados en la diferenciación y activación de células del sistema inmunitario [239, 240]. RUNX1 y RUNX3, al igual que PU.1, son considerados supresores de tumores [241, 242]. Se ha descrito que RUNX1 regula PU.1 a través de la ocupación de elementos contenidos en el URE (“upstream regulatory element”) de PU.1 [243]. Aunque no se ha implicado directamente a RUNX3 en la regulación de la expresión de PU.1, ambos factores de transcripción poseen *targets* comunes como CD11c y CD11b [240, 244, 245], lo que podría indicar una “regulación cruzada” y/o colaboración entre ambos factores. En este sentido, ya se ha descrito la acción conjunta de PU.1 con factores de transcripción característicos de linaje hematopoyético como c-Myb y RUNX en la regulación del gen de la elastasa y el receptor de M-CSF, respectivamente [235, 237]. En el caso de DC-SIGN, tanto RUNX1 como RUNX3 modulan su actividad transcripcional. Además, el elemento proximal Ets contenido en el promotor del gen de DC-SIGN media la respuesta colaborativa de RUNX3 y c-Myb con PU.1 (**Figura 15**). La participación de RUNX3 en la actividad del promotor de DC-SIGN se ajusta a su capacidad de modular la maduración de células dendríticas, ya que las células dendríticas RUNX3^{-/-} exhiben una maduración acelerada [246]. Por lo tanto, la disminución de PU.1 y el incremento de RUNX3 que ocurre durante dicho proceso [15], podrían justificar la disminución de la expresión de DC-SIGN en células dendríticas maduras.

Por otro lado, los altos niveles de PU.1 presentes en macrófagos activados alternativamente y el incremento de este factor promovido por la IL-4, sugieren que PU.1 podría ser expresado preferentemente durante las respuestas inmunitarias de tipo Th2. La implicación de PU.1 en la expresión inducida por IL-4 de la arginasa I en macrófagos [247] apoyaría esta hipótesis, dado que la arginasa I es un marcador característico de macrófagos alternativos [248]. En el caso de

la arginasa I, PU.1 también colabora con STAT6 y C/EBP β , y requiere la acción de otra proteína sintetizada de *novio* a través de la acción de IL-4/STAT6 [247]. Por tanto, la implicación de PU.1 en la expresión inducida por IL-4 de marcadores específicos de macrófagos alternativos (DC-SIGN en humanos y arginasa I en ratón) es consistente con los niveles relativos de PU.1 que se han observado en macrófagos alternativos y clásicos. El papel que PU.1 pudiera tener en la adquisición de otras funciones efectoras por parte de los macrófagos alternativos (actividad proangiogénica, deposición de matriz extracelular) es una cuestión que merecería ser estudiada más en profundidad.

Aunque la inducción de DC-SIGN por IL-4 es la mejor establecida, también se han descrito otras moléculas capaces de modular su expresión, tales como la IL-13 [177], IL-10 [249], IL-15 [250], IFN α/γ [178], dexametasona [178], TGF β [178] y cocaína [177, 178, 250, 251]. IL-10 promueve la generación *in vitro* de células dendríticas tolerogénicas [252], y es capaz de incrementar los niveles de DC-SIGN [249], por lo que IL-10 podría ser responsable de la expresión de DC-SIGN en dichas células dendríticas. Sin embargo, los experimentos realizados en nuestro laboratorio, además de los realizados por van Vliet y colaboradores [253], no reproducen el efecto de IL-10 sobre la expresión de DC-SIGN. Por lo que se refiere a IL-15, cuyo incremento tras la activación de TLRs en monocitos se ha propuesto que aumenta los niveles de DC-SIGN [250], experimentos realizados en nuestro laboratorio tampoco han reproducido su efecto potencial sobre la expresión de DC-SIGN. La dexametasona es un glucocorticoide que inhibe la transición de monocito a célula dendrítica, y previene la inducción de DC-SIGN durante dicho proceso [178]. En este sentido se podría argüir que todos los inhibidores de la diferenciación de monocitos a dendríticas afectarían a la expresión de DC-SIGN. Sin embargo, esta suposición no es correcta puesto que el incremento de los niveles de cAMP y cGMP impiden la adquisición de CD1a y la disminución de CD14 sin alterar la expresión de DC-SIGN [254].

IFN α , IFN γ y TGF β inhiben la inducción de DC-SIGN dependiente de IL-4 [178] (**Figura 15**). La inducción de genes por IL-4/IL-13 es inhibida por interferones tipo I [255], e IFN- γ suprime la inducibilidad por IL-4 bloqueando la fosforilación y translocación nuclear de STAT6 [256]. Por el contrario, aunque TGF- β bloquea la activación de JAK/STAT en otros sistemas [257], no se ha descrito su capacidad de inhibir la activación de STAT6 dependiente de IL-4 en monocitos, por lo que el efecto de TGF- β sobre la expresión de DC-SIGN podría ser independiente de la vía JAK/STAT [258]. En este sentido, es posible que el efecto de TGF- β sobre DC-SIGN sea vía PU.1. TGF- β es capaz de incrementar los niveles de Id2 [259], una molécula implicada en la generación de células de Langerhans [260] y que inhibe la unión de PU.1 al DNA [261]. Por tanto, la presencia de TGF- β durante la diferenciación de monocitos a células dendríticas incrementaría los niveles de Id2 e inhibiría la inducción de DC-SIGN. Este

mecanismo podría también explicar la disminución de DC-SIGN durante la maduración de células dendríticas, en la cual Id2 aumenta (datos sin publicar) simultáneamente con un descenso de los niveles de PU.1. En cuanto a la cocaína, su consumo correlaciona con niveles aumentados de DC-SIGN, lo que concuerda con su capacidad de incrementar los niveles de DC-SIGN en células dendríticas *in vitro* [251].

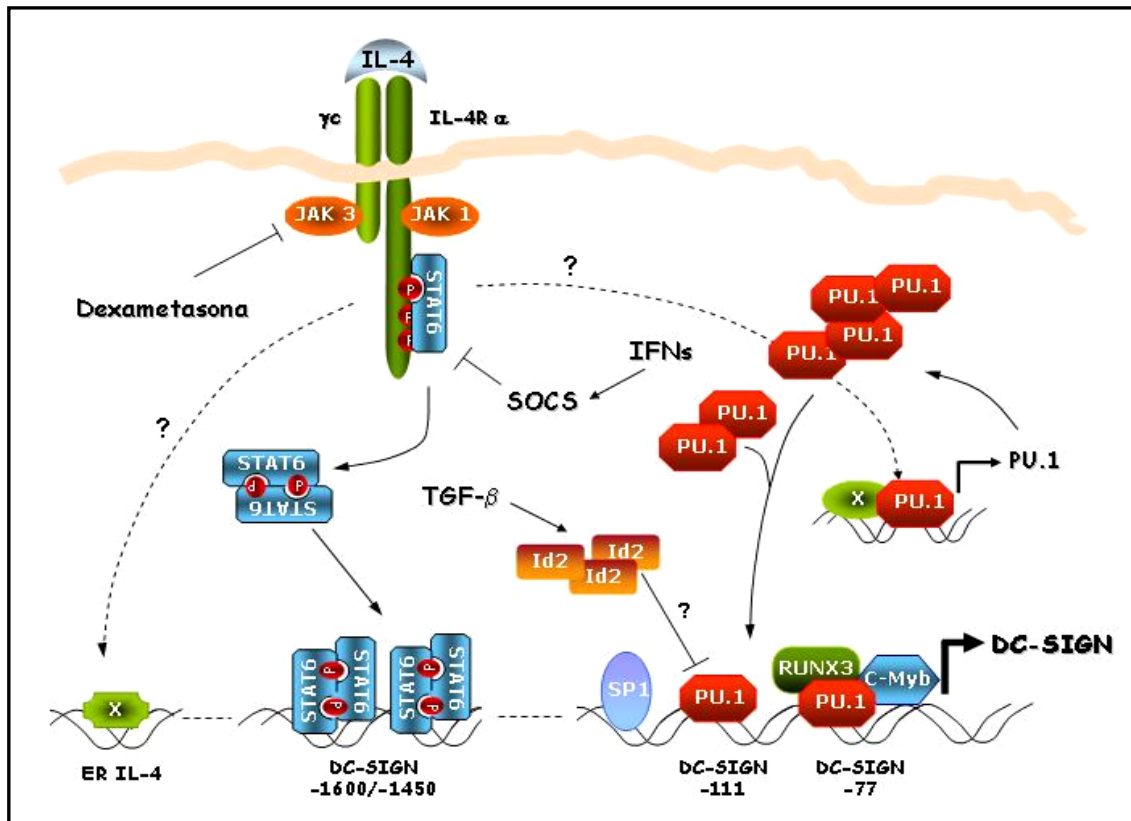


Figura 15.- Modelo de la regulación transcripcional del gen de DC-SIGN. Esquema de la regulación a nivel transcripcional de DC-SIGN. En el modelo se representan las posibles acciones de la IL-4 y otros reguladores de DC-SIGN (Dexametasona, IFNs, TGF-β), así como los factores de transcripción implicados en la regulación del gen de DC-SIGN y la posición del elemento al que se unen.

El análisis de las regiones reguladoras de los genes murinos homólogos a DC-SIGN podría ayudar a la identificación de su "ortólogo funcional", lo que validaría en cierta medida el empleo del sistema murino como modelo para el estudio de DC-SIGN. De todos los genes homólogos a DC-SIGN en el sistema murino, se propuso a SIGNR5/mDC-SIGN como la molécula con mayor homología a DC-SIGN, tanto por su alta expresión en células dendríticas como por su localización cromosómica contigua a CD23 [103]. Sin embargo, SIGNR3 es el que presenta una mayor homología estructural con DC-SIGN humano [103, 104]. La comparación del promotor de DC-SIGN con las secuencias reguladoras potenciales de sus genes murinos homólogos indica la presencia de secuencias conservadas entorno a la posición -111 en los genes de SIGNR1, SIGNR3 y SIGNR4, y que el elemento proximal -77 está conservado en SIGNR3 y SIGNR4. Sin

embargo, ninguno de estos dos elementos aparecen en SIGNR5/mDC-SIGN. Por tanto, la conservación o pérdida de estos elementos puede tener una relevancia funcional, aunque se requiere un mayor análisis de los patrones de expresión de todos los homólogos de DC-SIGN en ratón para poder evaluarlo.

Junto con otras lectinas tipo C en células dendríticas, DC-SIGN parece jugar un papel clave en los estadios iniciales de la infección por HIV debido a su capacidad para capturar y transferir el virus a linfocitos T [262]. La expresión de DC-SIGN en precursores de células dendríticas de sangre periférica y células dendríticas de mucosa es compatible con una contribución de la molécula a la expansión de HIV tras la infección por vía sanguínea [212] o sexual [209]. La participación de DC-SIGN en la infección por HIV ha llevado a estudiar si polimorfismos en el exón que codifica para la región del cuello [199] o en la región reguladora del gen [205] correlacionan con susceptibilidad a la infección por HIV-1. Un estudio realizado en la población Europea-Americana ha revelado que la variante polimórfica DC-SIGN-336G/A está asociada con un mayor riesgo a infecciones parenterales por HIV-1 [205]. Esta variante polimórfica también ha sido relacionada con una mayor susceptibilidad a otras enfermedades causadas por patógenos reconocidos por DC-SIGN, tales como tuberculosis y fiebre del Dengue. Sakuntabhai y colaboradores han publicado que en células HeLa la variante polimórfica DC-SIGN-336G muestra una mayor capacidad de unión del factor de transcripción Sp1, lo que sorprendentemente resulta en una menor actividad promotora [198]. Experimentos realizados en la línea mieloide THP-1 comparando ambas regiones promotoras (-336G y -336A) indican que no hay diferencias significativas en la actividad promotora de ambas formas polimórficas (datos no publicados), por lo que nuestros datos sugieren que el polimorfismo DC-SIGN-336G/A no posee relevancia funcional. La discrepancia entre resultados podría explicarse por el diferente sistema celular empleado, de tal forma que en células HeLa la variante -336G supone un elemento de unión para Sp1, mientras que dicha secuencia podría estar ocupada por otro factor de transcripción en células THP-1. Sin embargo, es posible que el factor de transcripción Sp1 juegue un papel en la regulación del promotor de DC-SIGN, ya que la construcción pCD209-468 es transactivada por Sp1 en células SL-2 (*Schneider's Drosophila Line 2*), que son deficientes en Sp1 (datos no publicados). Por lo tanto, Sp1 colaboraría en la regulación transcripcional de DC-SIGN, aunque posiblemente de forma independiente de la posición -336 (**Figura 15**).

Los macrófagos y células dendríticas expresan un elevado número de moléculas implicadas en captación antigénica (receptores *scavenger*, receptores Fc, receptores de complemento e integrinas) y en el reconocimiento de patógenos (TLR, NLR y CLR) [123]. La participación de PU.1 en la regulación de la expresión de DC-SIGN está en línea con su capacidad de regular la transcripción de los genes que codifican para TLR4 [263], CD68 [264], las integrinas CD11c y

CD11b [244, 245], y el receptor de manosa [265, 266]. Además, los mayores niveles de expresión de PU.1 en células dendríticas inmaduras *vs* maduras podría sugerir la colaboración de este factor en las funciones de reconocimiento de patógenos y captación de material extracelular llevadas a cabo por células dendríticas inmaduras. En consecuencia, DC-SIGN formaría parte del grupo de genes regulados por PU.1 e implicados en la adquisición del repertorio molecular para el reconocimiento de patógenos y captación antigénica que exhiben las células presentadoras de antígenos.

En definitiva, los resultados de esta parte inicial de la Tesis demuestran que el factor PU.1 determina la actividad basal y tejido específica de la región reguladora del gen de DC-SIGN a través de la ocupación *in vivo* de dos elementos Ets funcionales, y cuya integridad es asimismo requerida para las acciones cooperativas de PU.1 con otros factores de transcripción mieloides. Además, la contribución de PU.1 a la expresión de DC-SIGN viene apoyada por las alteraciones en los niveles de expresión de DC-SIGN en respuesta a cambios en los niveles celulares de PU.1.

2.- Análisis de la Expresión de LSEctin: estudio de los mecanismos que regulan su expresión basal e inducible en células de origen mieloide.

El gen de LSEctin, al igual que los genes de DC-SIGN, DC-SIGNR y CD23, forma parte del *cluster* de genes localizados en el cromosoma 19 (19p13.2). Estas cuatro lectinas tipo C presentan similitudes estructurales y funcionales, pero no son redundantes en cuanto a su patrón de expresión y algunas de sus funciones. CD23 se expresa en células mieloides y linfocitos B activados, donde funciona como receptor de baja afinidad para IgE y desempeña un papel en el control de las patologías mediadas por IgE [52, 267]. DC-SIGN se expresa en células mieloides [106, 178, 212], mientras que DC-SIGNR está presente en células endoteliales de hígado, nódulo linfático y placenta [157, 268]. LSEctin se describió originalmente como una molécula específica de células endoteliales de sinusoides hepáticos y de nódulo linfático [172]. El análisis original del RNA mensajero de LSEctin por Liu y colaboradores reveló su presencia en tejido hepático y nódulo linfático, pero no así en músculo esquelético, cerebro, riñón, placenta, timo, médula ósea, ni en ninguna línea hematopoyética ni células dendríticas derivadas de monocitos [172].

Junto con las células endoteliales sinusoidales y células de Ito, las células de Kupffer son una parte integrante de los sinusoides hepáticos, suponiendo hasta un 15% de todas las células hepáticas y más del 50% de los macrófagos residentes de todo el organismo [269]. Las células

de Kupffer presentan una gran capacidad endocítica, y retiran de la sangre proteínas del plasma y microorganismos potencialmente peligrosos, para mantener así la homeostasis tisular [270]. La localización genómica de LSECTin dentro del *cluster* de genes del cromosoma 19p13.2 nos indujo a plantear su expresión en células mieloides. Los resultados que se presentan en esta Tesis demuestran la presencia de LSECTin en células mieloides, como células de Kupffer, células dendríticas derivadas de monocitos, macrófagos activados por la vía alternativa *in vitro* y células mieloides tímicas. Por tanto, la expresión de LSECTin en el tejido hepático humano descrita por Liu y colaboradores podría justificarse por su presencia en las células de Kupffer. De hecho, la detección de RNA para LSECTin en células de Kupffer de rata y ratón (datos no publicados), junto con los resultados inmunohistoquímicos, sugieren la expresión preferencial de LSECTin en células de origen mieloides, lo cual es compatible con su expresión dependiente de PU.1 sobre la que discutiremos a continuación. Por otra parte, la débil detección de RNA para LSECTin en células de Ito de rata y ratón (datos no mostrados), y la capacidad de presentar antígeno de estas células [271, 272] podrían sugerir que LSECTin también se expresase en células de Ito humanas. Sin embargo, experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio con células de Ito humana no apoyan esta idea. A la luz de nuestros resultados, y los de otros investigadores, parece necesario re-evaluar la naturaleza de las células que expresan LSECTin en hígado y nódulo linfático. La confirmación de la expresión de LSECTin en células de Kupffer contribuiría a clarificar su función.

Actualmente no tenemos explicación para la discrepancia entre nuestros resultados y los publicados por Liu y colaboradores sobre la expresión de LSECTin en células dendríticas humanas [172]. La expresión de LSECTin en células dendríticas es consistente con su inducción en macrófagos activados alternativamente, ya que comparten un gran número de marcadores de membrana [180], y con la presencia de RNA de LSECTin en células mieloides de sangre periférica y tímicas. Dada su coexpresión y similar inducción por IL-4, sería interesante determinar si la expresión de DC-SIGN predice la de LSECTin, o si estas lectinas pueden expresarse independientemente. En este sentido, todas las células LSECTin positivas (incluidas líneas celulares) que hemos estudiado presentan también niveles detectables de DC-SIGN. Aunque un grupo describió la expresión de DC-SIGN en células endoteliales sinusoidales hepáticas y células de Kupffer [273], la existencia de anticuerpos monoclonales que reconocen tanto DC-SIGN como DC-SIGNR complican la interpretación de muchos de los resultados publicados. Por ello, aún no es posible determinar si LSECTin exhibe una distribución celular más amplia que la de DC-SIGN.

La expresión de LSECTin en células mieloides también está avalada por la actividad tejido específica de la región reguladora proximal del gen de LSECTin, que contiene hasta 6 posibles elementos de unión para PU.1 dentro de la región -250/+1. Los resultados del presente trabajo

demuestran que PU.1 se une a la región promotora de LSEctin *in vivo* y regula su expresión en células mieloides. Además, la disminución en los niveles de PU.1 provoca una reducción en los niveles de RNA mensajero de LSEctin, poniéndose de manifiesto el papel de PU.1 en la regulación transcripcional de LSEctin. Los comentarios realizados anteriormente sobre posibles alternativas para explicar el papel de PU.1 sobre la regulación de DC-SIGN son igualmente aplicables al caso de LSEctin. Por otra parte, la comparación de las distintas subpoblaciones celulares hepáticas indica una excelente correlación entre la presencia de RNA de LSEctin y PU.1 (datos no publicados), lo que apoya la naturaleza mieloides de esta lectina.

LSEctin se induce por IL-4 *in vitro* en monocitos, macrófagos y líneas celulares con capacidad para diferenciarse hacia célula dendrítica (THP-1 y MUTZ-3). La inducibilidad de la expresión de CD23, DC-SIGN y LSEctin por IL-4 [52, 178] podría indicar la existencia de un mecanismo común para su co-regulación en células mieloides. Los elementos de respuesta a IL-4 en el caso de DC-SIGN y LSEctin no parecen encontrarse en la región más proximal (-2000/+1) del promotor de ambos genes (datos no publicados). Según los resultados de esta Tesis, los promotores de LSEctin y DC-SIGN están regulados por PU.1. En el caso de CD23, aunque es bien conocida su regulación por IL-4, la participación de PU.1 en su regulación transcripcional aún no se ha descrito. Dado su patrón de expresión, es tentador sugerir que PU.1 podría regular también la expresión de CD23. En ese caso, PU.1 sería una molécula esencial en el control de la expresión de tres lectinas codificadas por genes contiguos en el genoma e implicadas en captura de antígeno.

La inducibilidad de LSEctin por IL-4 plantea su implicación preferencial en respuestas inmunitarias de tipo Th2, y sugiere la existencia de otros factores que determinen su expresión basal en condiciones homeostáticas. En cuanto a la primera cuestión, y aunque está bien establecido el papel de CD23 en el control de los niveles de IgE [52, 161, 164], la implicación de LSEctin en respuestas Th2 está aún por resolver (pero ver más adelante). Respecto a la expresión de LSEctin en condiciones homeostáticas, experimentos preliminares indican que es independiente de IL-4 e IL-13, ya que ratones deficientes para la cadena α del receptor de la IL-4 (IL-4R α) exhiben niveles de mensajero de LSEctin murino similares a los de los ratones silvestres (Aragoneses-Fenol, L, datos no publicados). Estos resultados están en consonancia con la expresión de las lectinas MGL y receptor de manosa, lectinas reguladas por IL-4 en macrófagos y células dendríticas, y consideradas marcadores de activación alternativa [152, 274-276], pero cuya expresión basal es también independiente de IL-4 [276, 277].

La expresión de LSEctin en células mieloides permite, por tanto, definir un *cluster* de genes que codifican lectinas de expresión exclusiva o preferencial en células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) e inducibles por IL-4.

3.- Caracterización Estructural y Funcional de LSECTin: determinación de las isoformas, reconocimiento de azúcares y posibles funciones de LSECTin.

LSECTin, DC-SIGN/R y CD23 no sólo muestran similitudes en su distribución celular o regulación transcripcional, sino que también se asemejan desde un punto de vista estructural y funcional (**Figura 16**). A nivel de aminoácidos, LSECTin presenta entre un 30-35% de identidad con las lectinas adyacentes [156]. En cuanto a la organización de sus dominios, todas ellas contienen un CRD codificado por tres exones independientes, aunque en este caso la homología entre DC-SIGN y LSECTin es algo mayor que la de esta última con CD23. A nivel del cuello, LSECTin y CD23 cuentan con diferente número de exones que codifican para esta región, mientras que en DC-SIGN y DC-SIGNR el cuello está codificado por un único exón. Además, LSECTin no contiene dominios repetidos en su región del cuello, una característica de DC-SIGN y DC-SIGNR. LSECTin, al igual que CD23 y DC-SIGN, posee cuatro repeticiones ricas en leucinas identificadas como las responsables de la capacidad de multimerización de estas moléculas [278]. En cuanto al dominio citoplásmico de LSECTin, existe un motivo basado en tirosinas similar al de CD23, y carece del dominio di-leucina presente en DC-SIGN. La comparación de secuencia de esta región indica que la cola citoplásmica de LSECTin se asemeja más a la CD23 [172]. Teniendo en cuenta todas estas características, LSECTin podría considerarse una molécula híbrida, por cuanto su dominio lectina es más homólogo al de DC-SIGN pero su región del cuello está relacionada estructuralmente con el de CD23. Si este carácter híbrido de LSECTin tiene una implicación funcional está aún por resolver.

LSECTin presenta al menos tres isoformas generadas por procesamiento alternativo, existiendo tanto isoformas integradas en la membrana como una isoforma sin región transmembrana (isoforma $\Delta 2$), y por ello potencialmente soluble (**Figura 16**). La isoforma $\Delta 2$ puede detectarse en el sobrenadante de células transfectadas, lo que sugiere su estabilidad en el medio extracelular y un posible papel como agente opsonizante. En este sentido, un gran número de lectinas expresadas en la superficie celular también poseen isoformas potencialmente solubles [87], e incluso muchas de ellas son capaces de reconocer patógenos [279]. CD23 muestra isoformas solubles detectables en el suero capaces de unir IgE y que, contrariamente a la forma de membrana, incrementa la síntesis de IgE [280]. Aunque existen RNAs mensajeros de DC-SIGN que codifican para formas potencialmente solubles, éstas aún no han sido detectadas en el suero [179], ni en el sobrenadante de células transfectadas (datos no publicados). Por otra parte, tanto CD23 como DC-SIGN y DC-SIGNR son susceptibles a la proteólisis por el alérgeno Der p 1 (del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*), una cisteín-proteasa que da lugar a formas potencialmente solubles [281]. Se ha sugerido que Der p 1

puede favorecer la respuesta inmunitaria Th2, ya que su acción sobre CD40, CD25 y CD23 provoca una disminución en la producción de IL-12 en células dendríticas [282], de IFN- γ en linfocitos T [283] y un aumento en la síntesis de IgE en células B [284]. La implicación funcional de la proteólisis de DC-SIGN y DC-SIGNR por Der p 1 no se conoce aún, pero la susceptibilidad a esta proteasa podría contribuir al desarrollo de la respuesta alérgica. Según experimentos realizados en nuestro laboratorio, LSEctin también es susceptible a la acción de esta cisteín-proteasa. LSEctin recombinante (región extracelular de LSEctin fusionada a una cola de histidinas) contiene varios sitios de corte para Der p 1, de los que ya hemos podido determinar uno (región del cuello, entre cisteína⁹⁵ y serina⁹⁶) (datos sin publicar). Según los datos publicados sobre DC-SIGN y DC-SIGNR, es presumible que LSEctin también sea susceptible a la acción de Der p 1 en la membrana de las células, pero aún no existen resultados que lo confirmen. Aunque es necesaria más información acerca de la presencia y función de las diferentes formas de LSEctin (forma soluble, proteolizada y de membrana) es posible que, tanto la pérdida de función de la molécula en membrana como la ganancia de función de la forma proteolizada/soluble, estén implicadas en el proceso alérgico. Por otra parte, estudios bioquímicos con LSEctin recombinante sugieren su capacidad de interactuar específicamente con IgE (datos no publicados), algo que podría implicar a LSEctin en la regulación de los niveles de IgE y en la homeostasis tisular. En este sentido, el hecho de estar relacionado con los niveles de IgE y ser susceptible a la acción del alérgeno Der p 1 sitúan a LSEctin en el marco de la alergia, tal y como ocurre con CD23.

Lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 19p13.2

	L-SIGN	DC-SIGN	LSEctin	CD23
Expresión mieloide	-	+	+	+
Expresión en hígado	+	-/+	+	?
Inducibilidad por IL-4 <i>in vitro</i>	-	+	+	+
Isoformas	+	+	+	+
Formas solubles	?	?	+	+
Reconocimiento de patógenos	+	+	+	?
Reconocimiento de proteínas solubles	?	+	+	+
Captura antigénica	+	+	+	+
Interacción célula-célula	+	+	?	+

Figura 16.- Características estructurales y funcionales de las lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 19p13.2. Comparación de las características de las cuatro lectinas, incorporando la información sobre LSEctin mostrada en la presente Tesis.

Los resultados de *glycoarray* de LSECTin han revelado que la especificidad de unión de LSECTin es poco usual con respecto a otros dominios de reconocimiento de carbohidratos y que reconoce con alta afinidad glicoproteínas terminadas en GlnNAc β 1-2Man [174]. La especificidad en el reconocimiento de azúcares de LSECTin difiere de la de CD23, DC-SIGN y DC-SIGNR, y por tanto, estas lectinas no parecen redundantes en términos funcionales. LSECTin contiene un motivo EPN en el sitio de unión a Ca²⁺ que confiere especificidad por manosa y GlnNAc [55]. LSECTin se describió inicialmente como una lectina con capacidad de unión a manosa, fucosa y GlnNAc [172], sin embargo, los resultados mostrados en el presente trabajo, junto con los de Gramberg y colaboradores [173], indican que LSECTin no reconoce manano. También en este sentido, datos de *glycoarray* indican que LSECTin recombinante une de manera específica el disacárido GlnNAc β 1-2Man, pero no interacciona con azúcares ricos en manosa [174]. De hecho, la sustitución de GlnNAc por galactosa en dicho disacárido reduce su reconocimiento por LSECTin, lo que implica que la presencia de manosa no es suficiente para la unión de LSECTin. [174]. Además, el hecho de que LSECTin se libere durante los lavados en experimentos de cromatografía de afinidad sobre manosa-sefariosa parece indicar que la afinidad de la lectina por este azúcar no es muy elevada, o que su interacción es poco estable [174]. Por último, nuestros resultados de especificidad de azúcares se correlaciona con la ausencia de unión de LSECTin a patógenos ricos en mananos expuestos (HIV [173], *Candida* y *Aspergillus*) (datos no publicados). Por tanto, se puede concluir que LSECTin une preferencialmente residuos de GlnNAc, y que posiblemente la interacción con manosa sea de baja afinidad. Sería necesario continuar el estudio para poder confirmar los datos anteriores y clarificar las funciones de LSECTin.

Por tanto, la existencia de un patrón de unión de azúcares diferente para DC-SIGN, DC-SIGNR y LSECTin implicaría un rango de reconocimiento de patógenos diferencial para estas lectinas. No obstante, la existencia de patógenos con un patrón heterogéneo de azúcares en su superficie posibilitaría su reconocimiento por lectinas con distinta especificidad. De hecho, glicoproteínas de filovirus y la proteína S del coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) son reconocidos por DC-SIGN, DC-SIGNR y LSECTin. A este respecto, la caracterización de las glicoproteínas del virus Ébola ha revelado la existencia de azúcares truncados en su superficie que justificaría el reconocimiento por LSECTin [174], mientras que los azúcares ricos en manosas serían los responsables de la unión a DC-SIGN y DC-SIGNR. [173].

Por analogía con otras lectinas, LSECTin podría reconocer también ligandos endógenos y mediar interacciones con otras células. Si este fuera el caso, LSECTin podría participar en la interacción de las células de Kupffer con las células estrelladas del hígado (células de Ito), un proceso de gran relevancia durante el daño y reparación del tejido hepático [285, 286]. A pesar

de que DC-SIGN y CD23 se han establecido como moléculas de adhesión y con capacidad de reconocer ligandos solubles, como la lipasa estimulada por sales biliares para el caso de DC-SIGN [287] e IgE para CD23 [288], en la actualidad no existen evidencias de ligandos endógenos (celulares o solubles) para LSEctin. El hecho de que DC-SIGN y CD23 sean capaces de unir Mac-1 (CD11b/CD18), sugiere que esta integrina podría ser un buen candidato para interactuar con LSEctin. DC-SIGN reconoce carbohidratos Lewis^x de Mac-1, mediando así la interacción entre células dendríticas y neutrófilos [107]. Sorprendentemente, DC-SIGN no es capaz de reconocer esta integrina expresada en otros tipos celulares, algo a tener en cuenta para la búsqueda de ligandos endógenos de LSEctin que pretendemos efectuar en el futuro. Por otra parte, y a diferencia de DC-SIGN y CD23, la expresión de LSEctin en la membrana celular no confiere agregación celular en transfectantes, aunque este hecho puede simplemente indicar la ausencia de los ligandos en los tipos celulares hasta ahora testados.

Muchas de las lectinas tipo C expresadas en células dendríticas contienen motivos basados en tirosina, di-leucina o ricos en glutámico en la región citoplásmica, y responsables de la internalización de los antígenos capturados para su posterior presentación [70]. La región citoplásmica de DC-SIGN interactúa con LSP1, una molécula implicada en la reorganización del citoesqueleto y morfología celular [289]. Dado que los transfectantes estables de K562-LSEctin presentan cambios morfológicos y emiten prolongaciones transitorias, es posible que LSEctin se asocie a proteínas del citoesqueleto. Experimentos preliminares realizados con células dendríticas derivadas de monocitos indicaron que LSEctin no se asocia a LSP1, aunque no descartamos que estén implicadas otras moléculas del citoesqueleto. La capacidad de internalización que posee LSEctin está en línea con las funciones efectoras de los macrófagos, células dendríticas y sinusoidales, las cuales capturan material extracelular, bien para el mantenimiento de la homeostasis tisular, bien para procesar antígenos. En el caso de LSEctin, y según muestran nuestros resultados, la capacidad de internalización tras la unión de su ligando depende de los motivos Y⁶SKW y E¹⁴E¹⁵ presentes en el dominio citoplásmico. El análisis del dominio intracelular de LSEctin también revela la presencia de una secuencia rica en triptófano, WXYWXYWXY, donde X es un aminoácido pequeño e Y es un residuo cargado positivamente. Aunque esta secuencia es homóloga a regiones contenidas en proteínas con motivos de trombospondina tipo I, su alteración no afecta a la internalización de LSEctin, lo cual no impide que pueda participar en otras funciones del dominio intracelular.

La retirada de productos derivados de bacterias, restos celulares y proteínas del plasma llevada a cabo por las células de Kupffer está mediada por un repertorio de moléculas *scavenger* presentes en su superficie [270, 290], por lo que LSEctin podría ser una más de estas moléculas que contribuyen a la "limpieza" y mantenimiento de la homeostasis. De hecho, la capacidad de LSEctin de reconocer GlnNAc β 1-2Man sugiere que podría ser un receptor

scavenger. Aunque GlnNAc-Man no es una secuencia terminal común en las glicoproteínas secretadas, si puede generarse como consecuencia de un proceso incompleto de biosíntesis o degradación por exoglicosilasas deficientes [174]. En estos casos, las glicoproteínas con residuos de GlnNAc terminales son rápidamente eliminadas de la circulación [291], por lo que LSEctin podría ser una de las moléculas responsables de este fenómeno, al igual que el receptor de manosa [129]. Por otra parte, células de origen hematopoyético DC-SIGN⁺ se asocian casi exclusivamente con timocitos apoptóticos en la zona cortical del timo, lo que sugiere un papel para DC-SIGN en la eliminación de este tipo de células [292]. Según resultados obtenidos en nuestro laboratorio, es posible que estas células sean coincidentes con las células LSEctin positivas presentes en timo, lo cual apoyaría la idea de que LSEctin fuera otro de los receptores *scavenger*.

La presencia de LSEctin en células dendríticas y macrófagos tímicos, así como en células endoteliales sinusoidales hepáticas y Kupffer, también sugiere un papel para LSEctin en el proceso de presentación de antígeno [293]. En este sentido, algunos estudios demuestran que además de las células epiteliales tímicas, las células presentadoras de origen hematopoyético también pueden mediar selección positiva [294, 295], y que posiblemente sea una subpoblación de estas células (hAPC) con características similares a las células dendríticas inmaduras y macrófagos (DC-SIGN⁺/CD68⁺/MR⁺/CD83⁻) las que medien la selección tímica positiva [292]. Según nuestros resultados, es posible que ambas lectinas (DC-SIGN/LSEctin) contribuyan al papel de las células presentadoras de origen hematopoyético en la presentación y selección positiva de los timocitos dentro de la zona cortical. Además, la expresión de LSEctin y DC-SIGN se ve disminuida durante el proceso de maduración de las células dendríticas, sugiriendo que estas lectinas desempeñarían su papel más relevante en las células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas inmaduras son importantes en la inducción de la tolerancia periférica, y su capacidad para capturar antígenos se ve disminuida una vez que adquieren capacidad de activar y polarizar a los linfocitos T. Como se ha demostrado en el caso de DEC-205 [67] y DC-SIGN [68], la generación de reactivos específicos para LSEctin podría ser una herramienta muy útil para evaluar su posible papel como un receptor de antígenos promotor de tolerancia. Estudios adicionales sobre los ligandos, especificidad, y capacidad señalizadora de LSEctin serán de utilidad para determinar si esta molécula funciona preferentemente como receptor de PAMPs, o si contribuye a la inducción de tolerancia y el mantenimiento de la homeostasis tisular. La existencia de un ortólogo en ratón posibilitará la generación de modelos animales donde poder analizar estas alternativas.

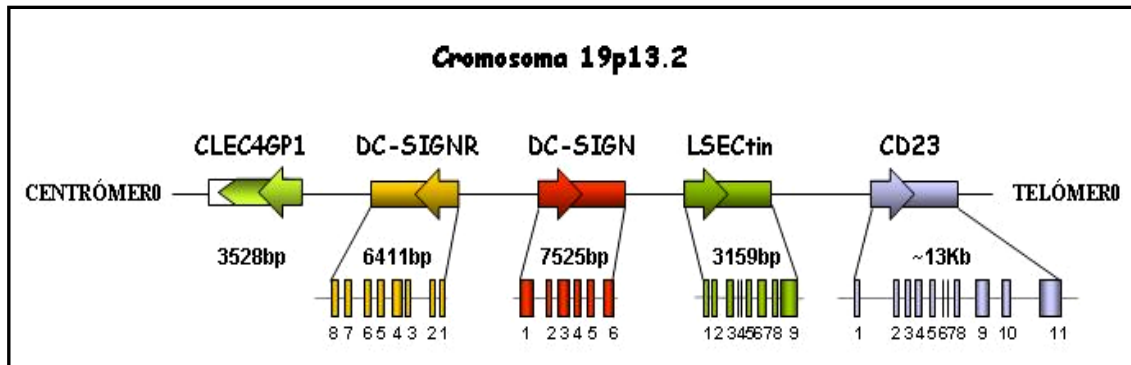


Figura 17.- Localización cromosómica de las lectinas tipo C codificadas en el cromosoma 19. En el esquema se representa la región cromosómica en la que se localiza LSECTin y las lectinas relacionadas. Aparecen representados los genes/pseudogen, su orientación, su número de pares de bases y los exones que los componen.

Por último, la información presente en esta Tesis relativa a la regulación de DC-SIGN y LSECTin, así como la caracterización de LSECTin a nivel de proteína, junto con la estructura génica, localización genómica, y orientación de los genes que codifican DC-SIGNR, DC-SIGN, LSECTin y CD23, sugieren la duplicación de un gen ancestral, posiblemente involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria de tipo Th2 [156, 172]. Además, en nuestro laboratorio hemos confirmamos la existencia de un pseudogen (CLEC4GP1) situado en la misma orientación y a continuación de DC-SIGNR, y con una secuencia nucleotídica muy homóloga a la de LSECTin (CLEC4G) (**Figura 17**). CLEC4GP1 se correspondería con la duplicación de LSECTin, al igual que ocurriría con DC-SIGN/DC-SIGNR, y posiblemente su falta de expresión haya modificado el patrón de distribución y función de LSECTin. En el caso de LSECTin/CLEC4GP1, es posible que se expresara el pseudogen, el patrón de expresión de CLEC4GP1 fuera similar al de DC-SIGNR, y el de LSECTin coincidente únicamente con el de DC-SIGN. Quizás esta sea una explicación para el hecho de que LSECTin, a pesar de pertenecer a un subgrupo con DC-SIGN y CD23, comparta algunas características con DC-SIGNR.

CONCLUSIONES

1. LSECTin se expresa en células mieloides, incluyendo células dendríticas y macrófagos aislados *ex vivo*, así como en células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos.
2. El gen de LSECTin da lugar a dos isoformas de membrana y a una isoforma potencialmente soluble, todas ellas inducibles por IL-4 *in vitro*.
3. LSECTin reconoce N-Acetil-Glucosamina y es capaz de unir el virus Ébola gracias a su interacción con la proteína GP1 de la envuelta del virus.
4. La unión del ligando a LSECTin desencadena una rápida internalización de la molécula, que es dependiente de motivos tirosina (Y⁶SKW) y diglutámico (E¹⁴E¹⁵) presentes en el dominio citoplásmico.
5. El factor de transcripción PU.1 regula la expresión de DC-SIGN y LSECTin en células mieloides mediante la interacción con elementos de DNA en sus regiones reguladoras proximales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hoffmann, J.A., et al., *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1313-8.
2. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
3. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 10-6.
4. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
5. Shortman, K. and C. Caux, *Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants*. Stem Cells, 1997. **15**(6): p. 409-19.
6. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
7. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
8. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau, *Dendritic cells*. Adv Immunol, 1999. **72**: p. 255-324.
9. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
10. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
11. Aragonese-Fenoll, L. and A.L. Corbi, *Dendritic cells: still a promising tool for cancer immunotherapy*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(2): p. 77-82.
12. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
13. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.
14. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1258-65.
15. Huang, Q., et al., *The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components*. Science, 2001. **294**(5543): p. 870-5.
16. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
17. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
18. Pulendran, B., *Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors*. Immunol Rev, 2004. **199**: p. 227-50.
19. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
20. Pulendran, B., *Variation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2457-65.
21. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
22. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.

23. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 103-10.
24. Thoma-Uszynski, S., et al., *Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors*. *Science*, 2001. **291**(5508): p. 1544-7.
25. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(8): p. 352-7.
26. Beutler, B., et al., *Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 353-89.
27. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(8): p. 447-54.
28. Anderson, K.V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. *Cell*, 1985. **42**(3): p. 779-89.
29. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-83.
30. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. *Cell*, 1988. **52**(2): p. 269-79.
31. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(1): p. 24-32.
32. Zarembek, K.A. and P.J. Godowski, *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 554-61.
33. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(2): p. 135-45.
34. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
35. Akira, S., *TLR signaling*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **311**: p. 1-16.
36. Albiger, B., et al., *Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors*. *J Intern Med*, 2007. **261**(6): p. 511-28.
37. Kopp, E. and R. Medzhitov, *Recognition of microbial infection by Toll-like receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(4): p. 396-401.
38. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and acquired immunity*. *Semin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 23-6.
39. Murray, P.J., *NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers?* *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(4): p. 352-8.
40. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 9-20.
41. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
42. Miceli-Richard, C., et al., *CARD15 mutations in Blau syndrome*. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 19-20.
43. Stockert, R.J., A.G. Morell, and I.H. Scheinberg, *Mammalian hepatic lectin*. *Science*, 1974. **186**(4161): p. 365-6.

44. Kilpatrick, D.C., *Animal lectins: a historical introduction and overview*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 187-97.
45. Boyd, W.C. and E. Shapleigh, *Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins*. J Immunol, 1954. **73**(4): p. 226-31.
46. Kawasaki, N., T. Kawasaki, and I. Yamashina, *Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum*. J Biochem (Tokyo), 1983. **94**(3): p. 937-47.
47. Ashwell, G. and J. Harford, *Carbohydrate-specific receptors of the liver*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 531-54.
48. Drickamer, K., *C-type lectin-like domains*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): p. 585-90.
49. Weis, W.I., M.E. Taylor, and K. Drickamer, *The C-type lectin superfamily in the immune system*. Immunol Rev, 1998. **163**: p. 19-34.
50. Wintergerst, E., et al., *The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent*. Eur J Cell Biol, 1989. **50**(2): p. 291-8.
51. East, L. and C.M. Isacke, *The mannose receptor family*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 364-86.
52. Kijimoto-Ochiai, S., *CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(4): p. 648-64.
53. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. Febs J, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
54. McGreal, E.P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon, *Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system*. Mol Immunol, 2004. **41**(11): p. 1109-21.
55. Drickamer, K., *Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein*. Nature, 1992. **360**(6400): p. 183-6.
56. Taylor, P.R., S. Gordon, and L. Martinez-Pomares, *The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition*. Trends Immunol, 2005. **26**(2): p. 104-10.
57. Dostert, C. and J. Tschopp, *DETeCTING fungal pathogens*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 17-8.
58. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
59. Engering, A., T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk, *Immune escape through C-type lectins on dendritic cells*. Trends Immunol, 2002. **23**(10): p. 480-5.
60. Caparros, E., et al., *DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production*. Blood, 2006.
61. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 507-17.
62. Gross, O., et al., *Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity*. Nature, 2006. **442**(7103): p. 651-6.
63. Hodges, A., et al., *Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 569-77.
64. Gringhuis, S.I., et al., *C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-kappaB*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 605-16.

65. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 353-7.
66. van Vliet, S.J., et al., *Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1200-8.
67. Bonifaz, L.C., et al., *In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 815-24.
68. Tacken, P.J., et al., *Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1278-85.
69. Carter, R.W., et al., *Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-I*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2276-84.
70. Mahnke, K., J. Knop, and A.H. Enk, *Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'*. Trends Immunol, 2003. **24**(12): p. 646-51.
71. Smith, A.L., et al., *Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 421-30.
72. Jongstra-Bilen, J. and J. Jongstra, *Leukocyte-specific protein 1 (LSP1): a regulator of leukocyte emigration in inflammation*. Immunol Res, 2006. **35**(1-2): p. 65-74.
73. Liu, L., et al., *LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration*. J Exp Med, 2005. **201**(3): p. 409-18.
74. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 769-79.
75. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1627-38.
76. Tacken, P.J., R. Torensma, and C.G. Figdor, *Targeting antigens to dendritic cells in vivo*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 599-608.
77. Ramakrishna, V., et al., *Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2845-52.
78. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts, *The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6770-6.
79. Schjetne, K.W., et al., *A mouse C kappa-specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation*. Int Immunol, 2002. **14**(12): p. 1423-30.
80. Delneste, Y., et al., *Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 353-62.
81. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
82. Hunger, R.E., et al., *Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 701-8.

83. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors*. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 551-60.
84. Mehta, J.L., et al., *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(1): p. 36-45.
85. Mi, Y., S.D. Shapiro, and J.U. Baenziger, *Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO₄ receptor is critical for implantation in vivo*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(2): p. 269-76.
86. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1258-65.
87. Cambi, A., M. Koopman, and C.G. Figdor, *How C-type lectins detect pathogens*. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(4): p. 481-8.
88. van Kooyk, Y., et al., *Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(4): p. 488-93.
89. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *DC-SIGN: escape mechanism for pathogens*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 697-709.
90. Lanoue, A., et al., *SIGN-RI contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice*. *J Exp Med*, 2004. **200**(11): p. 1383-93.
91. Kang, Y.S., et al., *The C-type lectin SIGN-RI mediates uptake of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae in the marginal zone of mouse spleen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 215-20.
92. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. *Immunity*, 2005. **22**(4): p. 507-17.
93. Takaki, R., S.R. Watson, and L.L. Lanier, *DAP12: an adapter protein with dual functionality*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 118-29.
94. Brown, G.D., et al., *Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans*. *J Exp Med*, 2003. **197**(9): p. 1119-24.
95. Gantner, B.N., et al., *Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2*. *J Exp Med*, 2003. **197**(9): p. 1107-17.
96. Chen, C.H., et al., *Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1459-67.
97. Caparros, E., et al., *DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3950-8.
98. van Liempt, E., et al., *Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation*. *Mol Immunol*, 2007.
99. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. *J Exp Med*, 2003. **197**(1): p. 7-17.
100. Steeghs, L., et al., *Neisseria meningitidis expressing lgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function*. *Cell Microbiol*, 2006. **8**(2): p. 316-25.
101. Turner, M.W., *The role of mannose-binding lectin in health and disease*. *Mol Immunol*, 2003. **40**(7): p. 423-9.
102. Holmskov, U., S. Thiel, and J.C. Jensenius, *Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 547-78.

103. Park, C.G., et al., *Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN*. *Int Immunol*, 2001. **13**(10): p. 1283-90.
104. Powlesland, A.S., et al., *Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20440-9.
105. Kang, Y.S., et al., *A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q*. *Cell*, 2006. **125**(1): p. 47-58.
106. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. *Cell*, 2000. **100**(5): p. 575-85.
107. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
108. van Gisbergen, K.P., et al., *Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5935-44.
109. van Gisbergen, K.P., et al., *Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(27): p. 6159-68.
110. Lecoanet-Henchoz, S., et al., *CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18*. *Immunity*, 1995. **3**(1): p. 119-25.
111. Ariizumi, K., et al., *Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20157-67.
112. Ryan, E.J., et al., *Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5638-48.
113. Allavena, P., et al., *From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor*. *Crit Rev Immunol*, 2004. **24**(3): p. 179-92.
114. Valladeau, J., et al., *The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(9): p. 2695-704.
115. Valladeau, J., et al., *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules*. *Immunity*, 2000. **12**(1): p. 71-81.
116. Ward, E.M., et al., *Polymorphisms in human langerin affect stability and sugar binding activity*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(22): p. 15450-6.
117. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 975-83.
118. Mizumoto, N. and A. Takashima, *CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(5): p. 658-60.
119. de Witte, L., et al., *Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells*. *Nat Med*, 2007. **13**(3): p. 367-71.
120. Kato, M., et al., *Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes*. *Int Immunol*, 2006. **18**(6): p. 857-69.

121. Butler, M., et al., *Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205-DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation.* Immunology, 2007. **120**(3): p. 362-71.
122. Mahnke, K., et al., *The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments.* J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 673-84.
123. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 77-84.
124. Kato, M., et al., *Hodgkin's lymphoma cell lines express a fusion protein encoded by intergenically spliced mRNA for the multilectin receptor DEC-205 (CD205) and a novel C-type lectin receptor DCL-1.* J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34035-41.
125. Liu, Y., et al., *Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand.* J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1105-16.
126. Irijala, H., et al., *Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium.* J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1033-42.
127. Lee, S.J., et al., *Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice.* Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 437-45.
128. Swain, S.D., et al., *Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to Pneumocystis carinii infection in vivo.* Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6213-21.
129. Lee, S.J., et al., *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis.* Science, 2002. **295**(5561): p. 1898-901.
130. Flornes, L.M., et al., *Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex.* Immunogenetics, 2004. **56**(7): p. 506-17.
131. Hermanz-Falcon, P., et al., *Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells.* Immunogenetics, 2001. **53**(4): p. 288-95.
132. Gavino, A.C., et al., *Identification and expression profiling of a human C-type lectin, structurally homologous to mouse dectin-2.* Exp Dermatol, 2005. **14**(4): p. 281-8.
133. Kanazawa, N., et al., *Molecular cloning of human dectin-2.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(6): p. 1522-4.
134. McGreal, E.P., et al., *The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose.* Glycobiology, 2006. **16**(5): p. 422-30.
135. Bates, E.E., et al., *APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif.* J Immunol, 1999. **163**(4): p. 1973-83.
136. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.* J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
137. Arce, I., et al., *Molecular and genomic characterization of human DLEC, a novel member of the C-type lectin receptor gene family preferentially expressed on monocyte-derived dendritic cells.* Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2733-40.

138. Bonkobara, M., et al., *Ultraviolet-B radiation upregulates expression of dectin-2 on epidermal Langerhans cells by activating the gene promoter*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(4): p. 944-8.
139. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
140. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-7.
141. Gantner, B.N., R.M. Simmons, and D.M. Underhill, *Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments*. Embo J, 2005. **24**(6): p. 1277-86.
142. Gersuk, G.M., et al., *Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different Aspergillus fumigatus cellular states*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3717-24.
143. Steele, C., et al., *Alveolar macrophage-mediated killing of Pneumocystis carinii f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor*. J Exp Med, 2003. **198**(11): p. 1677-88.
144. Viriyakosol, S., et al., *Innate immunity to the pathogenic fungus Coccidioides posadasii is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1553-60.
145. Taylor, P.R., et al., *Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 31-8.
146. Saijo, S., et al., *Dectin-1 is required for host defense against Pneumocystis carinii but not against Candida albicans*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 39-46.
147. Lavigne, L.M., J.E. Albina, and J.S. Reichner, *Beta-glucan is a fungal determinant for adhesion-dependent human neutrophil functions*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8667-75.
148. Meyer-Wentrup, F., et al., *Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 154-62.
149. Suzuki, N., et al., *Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 128-35.
150. Higashi, N., et al., *The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20686-93.
151. Valladeau, J., et al., *Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5767-74.
152. Raes, G., et al., *Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(3): p. 321-7.
153. Takada, A., et al., *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 2943-7.
154. van Vliet, S.J., et al., *Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells*. Int Immunol, 2005. **17**(5): p. 661-9.
155. Saeland, E., et al., *The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2006.

156. Soilleux, E.J., R. Barten, and J. Trowsdale, *DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 2937-42.
157. Pohlmann, S., et al., *DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2670-5.
158. Bashirova, A.A., et al., *A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 671-8.
159. Yokota, A., et al., *Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression*. Cell, 1988. **55**(4): p. 611-8.
160. Vercelli, D., et al., *The B-cell binding site on human immunoglobulin E*. Nature, 1989. **338**(6217): p. 649-51.
161. Aubry, J.P., et al., *CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production*. Nature, 1992. **358**(6386): p. 505-7.
162. Hermann, P., et al., *The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 767-75.
163. Kilmon, M.A., et al., *Regulation of IgE production requires oligomerization of CD23*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3139-45.
164. Payet, M. and D.H. Conrad, *IgE regulation in CD23 knockout and transgenic mice*. Allergy, 1999. **54**(11): p. 1125-9.
165. Hewitt, C.R., et al., *A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1537-44.
166. Lemieux, G.A., et al., *The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14836-44.
167. Weskamp, G., et al., *ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1293-8.
168. Fourie, A.M., et al., *Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30469-77.
169. Schulz, O., et al., *Cleavage of the low-affinity receptor for human IgE (CD23) by a mite cysteine protease: nature of the cleaved fragment in relation to the structure and function of CD23*. Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 584-8.
170. Munoz, O., et al., *Binding of anti-CD23 monoclonal antibody to the leucine zipper motif of FcepsilonRII/CD23 on B cell membrane promotes its proteolytic cleavage. Evidence for an effect on the oligomer/monomer equilibrium*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31795-800.
171. Rezzonico, R., et al., *Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3868-77.
172. Liu, W., et al., *Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECTin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18748-58.

173. Gramberg, T., et al., *LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus*. *Virology*, 2005. **340**(2): p. 224-36.
174. Powlesland, A.S., et al., *A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans*. *J Biol Chem*, 2007.
175. Curtis, B.M., S. Scharnowske, and A.J. Watson, *Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 8356-60.
176. Soilleux, E.J., et al., *Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV*. *J Pathol*, 2001. **195**(5): p. 586-92.
177. Soilleux, E.J., et al., *Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(3): p. 445-57.
178. Relloso, M., et al., *DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2634-43.
179. Mummidi, S., et al., *Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(35): p. 33196-212.
180. Puig-Kroger, A., et al., *Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25680-8.
181. Cambi, A., et al., *Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(1): p. 145-55.
182. Appelmelk, B.J., et al., *Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 1635-9.
183. Guo, Y., et al., *Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(7): p. 591-8.
184. Bernhard, O.K., et al., *Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required for ligand binding but no association with CD4*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(50): p. 51828-35.
185. Feinberg, H., et al., *Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1327-35.
186. Engering, A., et al., *The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2118-26.
187. Bogoevska, V., et al., *CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues*. *Glycobiology*, 2006. **16**(3): p. 197-209.
188. Granelli-Piperno, A., et al., *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction*. *J Immunol*, 2005. **175**(7): p. 4265-73.
189. Real, E., et al., *Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing*

- nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen. J Immunol, 2004. 173(1): p. 50-60.*
190. Gijzen, K., et al., *Relevance of DC-SIGN in DC-induced T cell proliferation. J Leukoc Biol, 2007. 81(3): p. 729-40.*
191. Tailleux, L., et al., *DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. J Exp Med, 2003. 197(1): p. 121-7.*
192. Cambi, A., et al., *The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells. Eur J Immunol, 2003. 33(2): p. 532-8.*
193. Serrano-Gomez, D., et al., *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of Aspergillus fumigatus conidia by dendritic cells and macrophages. J Immunol, 2004. 173(9): p. 5635-43.*
194. Colmenares, M., et al., *Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. J Biol Chem, 2002. 277(39): p. 36766-9.*
195. Cormier, E.G., et al., *L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(39): p. 14067-72.*
196. Marzi, A., et al., *DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol, 2004. 78(21): p. 12090-5.*
197. Takahara, K., et al., *Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. Int Immunol, 2004. 16(6): p. 819-29.*
198. Sakuntabhai, A., et al., *A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nat Genet, 2005. 37(5): p. 507-13.*
199. Liu, H., et al., *Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. J Infect Dis, 2004. 190(6): p. 1055-8.*
200. Liu, H., et al., *Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. Gene, 2003. 313: p. 149-59.*
201. Barreiro, L.B., et al., *Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. PLoS Med, 2006. 3(2): p. e20.*
202. Vannberg, F.O., et al., *CD209 Genetic Polymorphism and Tuberculosis Disease. PLoS ONE, 2008. 3(1): p. e1388.*
203. Gomez, L.M., et al., *Analysis of DC-SIGN (CD209) functional variants in patients with tuberculosis. Hum Immunol, 2006. 67(10): p. 808-11.*
204. Ben-Ali, M., et al., *Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. Hum Immunol, 2007. 68(11): p. 908-912.*
205. Martin, M.P., et al., *Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol, 2004. 78(24): p. 14053-6.*
206. Koizumi, Y., et al., *RANTES -28G Delays and DC-SIGN - 139C Enhances AIDS Progression in HIV Type 1-Infected Japanese Hemophiliacs. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. 23(5): p. 713-719.*

207. Nunez, C., et al., *A functional variant in the CD209 promoter is associated with DQ2-negative celiac disease in the Spanish population*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(27): p. 4397-400.
208. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 33-54.
209. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
210. van Lent, P.L., et al., *Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(2): p. 360-9.
211. Engering, A., et al., *Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1587-95.
212. Engering, A., et al., *Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1780-6.
213. Friedman, A.D., *Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3377-90.
214. Klemsz, M.J., et al., *The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene*. Cell, 1990. **61**(1): p. 113-24.
215. Scott, E.W., et al., *Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages*. Science, 1994. **265**(5178): p. 1573-7.
216. McKercher, S.R., et al., *Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities*. Embo J, 1996. **15**(20): p. 5647-58.
217. Chen, H.M., et al., *Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2918-28.
218. Janknecht, R. and A. Nordheim, *Gene regulation by Ets proteins*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1155**(3): p. 346-56.
219. Anderson, K.L., et al., *Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3702-10.
220. Oikawa, T., et al., *The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(7): p. 599-608.
221. DeKoter, R.P. and H. Singh, *Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1439-41.
222. Dahl, R., et al., *Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1029-36.
223. Laslo, P., et al., *Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates*. Cell, 2006. **126**(4): p. 755-66.
224. Carey, J.O., et al., *Phorbol ester-stimulated phosphorylation of PU.1: association with leukemic cell growth inhibition*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4316-24.
225. Mazzi, P., et al., *IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4941-7.

226. Lodie, T.A., et al., *Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II*. J Immunol, 1997. **158**(4): p. 1848-56.
227. Pongubala, J.M., et al., *Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation*. Science, 1993. **259**(5101): p. 1622-5.
228. Wang, J.M., M.Z. Lai, and H.F. Yang-Yen, *Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1896-909.
229. Guerriero, A., et al., *PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells*. Blood, 2000. **95**(3): p. 879-85.
230. Anderson, K.L., et al., *Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1855-61.
231. Iwama, A., et al., *Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 547-58.
232. Rappocciolo, G., et al., *DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes*. PLoS Pathog, 2006. **2**(7): p. e70.
233. Xue, Y., P. Alford, and R.E. Shackelford, *Protein kinase C activation increases binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(1): p. 211-4.
234. Pesu, M., et al., *PU.1 is required for transcriptional activation of the Stat6 response element in the Igepsilon promoter*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1727-35.
235. Oelgeschlager, M., et al., *C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4717-25.
236. Hohaus, S., et al., *PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5830-45.
237. Petrovick, M.S., et al., *Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3915-25.
238. Durst, K.L. and S.W. Hiebert, *Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4220-4.
239. de Bruijn, M.F. and N.A. Speck, *Core-binding factors in hematopoiesis and immune function*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4238-48.
240. Puig-Kroger, A. and A. Corbi, *RUNX3: a new player in myeloid gene expression and immune response*. J Cell Biochem, 2006. **98**(4): p. 744-56.
241. Tenen, D.G., *Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(2): p. 89-101.
242. Koschmieder, S., et al., *Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia*. Int J Hematol, 2005. **81**(5): p. 368-77.
243. Huang, G., et al., *PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 51-60.
244. Lopez-Rodriguez, C. and A.L. Corbi, *PU.1 negatively regulates the CD11c integrin gene promoter through recognition of the major transcriptional start site*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1843-7.

245. Pahl, H.L., et al., *The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 5014-20.
246. Fainaru, O., et al., *Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation*. Embo J, 2004. **23**(4): p. 969-79.
247. Pauleau, A.L., et al., *Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7565-73.
248. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
249. Gurney, K.B., et al., *Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN+ cells in human rectal mucosa*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5762-73.
250. Krutzik, S.R., et al., *TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells*. Nat Med, 2005. **11**(6): p. 653-60.
251. Nair, M.P., et al., *Cocaine modulates dendritic cell-specific C type intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin expression by dendritic cells in HIV-1 patients*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6617-26.
252. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
253. van Vliet, S.J., et al., *Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 577-85.
254. Giordano, D., et al., *Cyclic nucleotides promote monocyte differentiation toward a DC-SIGN+ (CD209) intermediate cell and impair differentiation into dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6421-30.
255. Dickensheets, H.L. and R.P. Donnelly, *Inhibition of IL-4-inducible gene expression in human monocytes by type I and type II interferons*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 307-12.
256. Dickensheets, H.L. and R.P. Donnelly, *IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6226-33.
257. Bright, J.J. and S. Sriram, *TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1772-7.
258. Dickensheets, H.L., et al., *Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10800-5.
259. Hacker, C., et al., *Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 380-6.
260. Heinz, L.X., et al., *Differential involvement of PU.1 and Id2 downstream of TGF-beta1 during Langerhans-cell commitment*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1445-53.
261. Iavarone, A., et al., *Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1040-5.
262. Turville, S.G., et al., *HIV gp120 receptors on human dendritic cells*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2482-8.
263. Rehli, M., et al., *PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9773-81.

264. Li, A.C., et al., *The macrosialin promoter directs high levels of transcriptional activity in macrophages dependent on combinatorial interactions between PU.1 and c-Jun*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5389-99.
265. Eichbaum, Q., et al., *Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors PU.1 and SP1*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4135-43.
266. Egan, B.S., K.B. Lane, and V.L. Shepherd, *PU.1 and USF are required for macrophage-specific mannose receptor promoter activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 9098-107.
267. Yu, P., et al., *Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23*. Nature, 1994. **369**(6483): p. 753-6.
268. Mukhtar, M., et al., *Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN*. Virology, 2002. **297**(1): p. 78-88.
269. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
270. Naito, M., et al., *Differentiation and function of Kupffer cells*. Med Electron Microsc, 2004. **37**(1): p. 16-28.
271. Vinas, O., et al., *Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 919-29.
272. Winau, F., et al., *Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 117-29.
273. Lai, W.K., et al., *Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles*. Am J Pathol, 2006. **169**(1): p. 200-8.
274. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
275. Martinez-Pomares, L., et al., *Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(5): p. 604-13.
276. Dupasquier, M., et al., *The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 838-49.
277. Linehan, S.A., et al., *IL-4 receptor signaling is required for mannose receptor expression by macrophages recruited to granulomata but not resident cells in mice infected with Schistosoma mansoni*. Lab Invest, 2003. **83**(8): p. 1223-31.
278. Beavil, A.J., et al., *Alpha-helical coiled-coil stalks in the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) and related C-type lectins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 753-7.
279. Ji, X., H. Gewurz, and G.T. Spear, *Mannose binding lectin (MBL) and HIV*. Mol Immunol, 2005. **42**(2): p. 145-52.
280. Shakib, F., O. Schulz, and H. Sewell, *A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity*. Immunol Today, 1998. **19**(7): p. 313-6.
281. Furmonaviciene, R., et al., *The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(2): p. 231-42.

282. Ghaemmaghami, A.M., et al., *The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(10): p. 1468-75.
283. Ghaemmaghami, A.M., et al., *Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN-gamma*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1211-6.
284. Schulz, O., et al., *Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23)*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3191-4.
285. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
286. Friedman, S.L., *Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 29-32.
287. Naarding, M.A., et al., *Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3256-64.
288. Yukawa, K., et al., *A B cell-specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (Fc epsilon R) on lymphocytes*. J Immunol, 1987. **138**(8): p. 2576-80.
289. Howard, T.H., J. Hartwig, and C. Cunningham, *Lymphocyte-specific protein 1 expression in eukaryotic cells reproduces the morphologic and motile abnormality of NAD 47/89 neutrophils*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4786-95.
290. Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis, *Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7413-20.
291. Jones, A.J., et al., *Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys*. Glycobiology, 2007. **17**(5): p. 529-40.
292. Paessens, L., D. Fluitsma, and Y. van Kooyk, *Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes*. J Pathol, 2007.
293. Wu, L. and K. Shortman, *Heterogeneity of thymic dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. **17**(4): p. 304-12.
294. Liu, Y.J., *A unified theory of central tolerance in the thymus*. Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 215-21.
295. Bix, M. and D. Raulet, *Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 330-3.

ANEXO

Durante la realización de la Tesis he participado en diferentes proyectos que han resultado en la publicación de los siguientes artículos:

1.- Ruiz-Velasco N, **Domínguez-Soto A**, Vega MA. Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. **Biochem Pharmacol**, **67:303-313, 2004**.

2.- Serrano-Gomez D, Puig-Kroger A, Caparros E, **Domínguez-Soto A**, Relloso M, Colmenares M, Martinez-Munoz L, Longo N, Sanchez-Sanchez N, Rincon M, Rivas L, Sanchez-Mateos P, Fernandez-Ruiz E, Corbi AL. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. **J Biol Chem.**, **279(24):25680-8, 2004**.

3.- Serrano-Gomez D, **Domínguez-Soto A**, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. **J Immunol**. **173:5635-43, 2004**.

4.- **Domínguez-Soto, A.**, Puig-Kröger, A., Vega, M.A., y Corbí, A.L. PU.1 binds to and regulates the activity of the proximal regulatory region of the DC-SIGN gene. **J. Biol. Chem.**, **280:33123-31, 2005**.

5.- **Domínguez-Soto, A.**, Relloso, M., Vega, MA, Corbí A.L. and Puig-Kröger, A. RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters. **Immunobiology**, **210:133-9, 2005**.

6.- Puig-Kroger A, **Domínguez-Soto A**, Martinez-Munoz L, Serrano-Gomez D, Lopez-Bravo M, Sierra-Filardi E, Fernandez-Ruiz E, Ruiz-Velasco N, Ardavin C, Groner Y, Tandon N, Corbi AL, Vega MA. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. **J Immunol**, **177:2107-14, 2006**.

7.- **Domínguez-Soto, A.**, Aragonese-Fenoll, L., Martín-Gayo, E., Martínez-Prats, L, Colmenares, M., Naranjo-Gómez, M, Borrás, F., Muñoz, P., Zubiaur, M., Toribio, ML., Delgado, R., y Corbí, AL. The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. **Blood**, **109:5337-45, 2007**.

8.- Domínguez-Soto, A., y Corbí, AL. Myeloid dendritic cell lectins and their role in immune responses. **Curr. Opin. Invest. Drugs, 8:910-20, 2007.**

9.- Puig-Kröger, A., Martínez-Nuñez, Rocio T., Sánchez-Elsner T., **Domínguez-Soto, A.,** Martín-Gayo, E., Toribio, M.L., García de Lacoba, M., Groner, Y., y Corbí, A.L. RUNX3 isoforms regulate myeloid cell adhesion and migration, and contribute to the maturation state of dendritic cells. **Manuscrito enviado para publicación, 2007.**

10.- Domínguez-Soto A., Caparrós, E., Serrano-Gómez, D., Fraga, J., Rivas, L., Corbí, A.L y Colmenares, M. Leishmania entry in Alternatively Activated Macrophages is DC-SIGN dependent, and results in parasite survival and IL-10 production. **Manuscrito en preparación.**

11.- Domínguez-Soto, A., Aragoneses-Fenoll, L., Corcuera, M., Gómez-Aguado, F., García-Monzón, C., Bustos, M., Corbí A.L. LSEctin is expressed in Kupffer cells and its expression is regulated by PU.1. **Manuscrito en preparación.**