



11281
24
Envío a la Dirección General de Bibliotecas:
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo recepcional
NOMBRE: Jesús Martínez B
FECHA: 23-abril-2003
FIRMA: Jesús Martínez B

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**“GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN
CD40-L (CD154) ECTÓPICAMENTE COMO MODELOS DE
AUTOINMUNIDAD”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
(INMUNOLOGÍA)**

P R E S E N T A:

JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE

TUTOR ACADÉMICO: DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ

MÉXICO, 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Dedico este trabajo a aquellos que luchan porque la Universidad siga siendo pública.

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

Agradecimientos

Agradezco antes que a nadie el apoyo incondicional de mis Padres. Gracias por la confianza y libertad que me han brindado...

...A mis Maestros, miembros del comité tutorial, Dr José Moreno Rodríguez, Dr Vianney Ortiz Navarrete y Dr. Leopoldo Santos Argumedo. Gracias por las enseñanzas y la confianza brindada...

...A tantos de mis Maestros. Gracias por sus enseñanzas y diversas formas de apoyo para poder realizar este trabajo. En especial al Dr Richard A. Flavell, Dr Carlos Rosales Ledezma, Yvonne Rosenstein Azoulay, Dr Vicente Madrid Marina, Dr. Mario Henry Rodríguez, Dr Humberto Lanz y al Dr Leopoldo Flores Romo...

...A Kelly, Jordane, Sophia y Luciana por constituir mi realidad, equilibrarme y orientarme en el camino...

.... a todos, Gracias!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice.

Lista de Abreviaturas	8
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción General.	11
I.1. Ontogenia de linfocitos B.	12
1.1.1. Generación de precursores comprometidos al linaje B.	
1.1.2. Generación del receptor preB.	
1.1.3. Generación de linfocitos B inmaduros: Expresión del receptor de linfocitos B en superficie.	
1.1.4. Linfocitos B inmaduros: Migración a órganos linfoides secundarios.	
I.2. Inducción de la respuesta inmune de linfocitos B maduros	21
1.2.1. Componentes del RLB y sus mecanismos de señalización.	
1.2.2. Moléculas co-receptoras asociadas al RLB.	
1.2.3. Tipos de respuestas inmunes mediadas por linfocitos B.	
1.2.4. Respuesta humoral dependiente de linfocitos T.	
1.2.5. Respuesta humoral independiente de linfocitos T.	
1.2.6. Subpoblaciones de linfocitos B y su papel en la respuesta humoral.	
I.3. Selección positiva en linfocitos B.	29
I.4. Tolerancia de linfocitos B	32
1.4.1. Deleción clonal.	
1.4.2. Anergia clonal	
1.4.3. Edición de receptor	
I.5. Papel biológico del receptor CD40 y su ligando CD154.	36
1.5.1. El receptor CD40	
1.5.2. Expresión y función de CD40	
1.5.3. Activación y vías de señalización a través de CD40	
1.5.4. El ligando de CD40: CD154	
1.5.5. Expresión y función de CD154	
I.6. La interacción CD40-CD154 en procesos patológicos.	43
II. Planteamiento del Problema.	45

III. Hipótesis. 46

IV. Objetivos. 47

V. Materiales y Métodos. 48

- V.1. Obtención de secuencias para la construcción del transgén
- V.2. Construcción del transgén
- V.3. Generación de ratones transgénicos
- V.4. Genotipificación de ratones transgénicos
- V.5. Preparación de células linfoides, tinción y análisis citofluorométrico
- V.6. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo
- V.7. Determinación de anticuerpos anti-fosfatidilcolina
- V.8. Determinación de inmunoglobulina anti-eritrocito de camero
- V.9. Evaluación de la expresión del transgén por RT-PCR
- V.10. Determinación de inmunoglobulina sérica

VI. Resultados. 62

VI.1. Generación y caracterización de ratones transgénicos. 62

- VI.1.1. Generación de ratones transgénicos.
- VI.1.2. Establecimiento de líneas transgénicas
- VI.1.3. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas
- VI.1.4. Linfocitos B en órganos linfoides secundarios.
- VI.1.5. Maduración de linfocitos B en la médula ósea
- VI.1.6. Linfocitos T.
- VI.1.7. Células granulo-monocíticas
- VI.1.8. Expresión del transgén en la superficie celular
- VI.1.9. Caracterización de la expresión del transgén mediante RT-PCR
- VI.1.10. Análisis anatómico e histopatológico.
- VI.1.11. Identificación de fenotipos inconsistentes
- VI.1.12. El fenotipo observado en ratones transgénicos es dependiente de la interacción CD40-CD154

VI. 2. Análisis del compartimiento de linfocitos B. 87

- VI.2.1. Análisis ontogénico del número de linfocitos B
- VI.2.2. Bazo
- VI.2.3. Hígado neonatal y médula ósea
- VI.2.4. Caracterización fenotípica de linfocitos B esplénicos.
- VI.2.5. Análisis de las fases del ciclo celular en linfocitos B esplénicos de ratones transgénicos adultos
- VI.2.6. Análisis de linfocitos B de cavidad peritoneal
- VI.2.7. Análisis del estado funcional de linfocitos B mediante la determinación de inmunoglobulina sérica
- VI.2.8. Producción de Ig en respuesta a la inmunización con un antígeno tímo-dependiente

VI.3. Influencia del receptor de antígeno sobre el desarrollo de linfocitos B en ratones transgénicos para CD154.	112
VI.3.1.Efecto del transgén de inmunoglobulina rearreglada sobre la maduración de linfocitos B en médula ósea de ratones transgénicos para CD154	
VI.3.2.Significado de la expresión de CD5 por linfocitos B de ratones dobles transgénicos para CD154 y receptor de antígeno anti-LG	
VI.3.3.Evaluación de la producción de anticuerpos anti-fosfatidil colina en ratones transgénicos	
VII. Discusión.	126
VII.1.Validación del modelo	
VII.2.Efectos de la expresión de CD154 en linfocitos B y sus repercusiones en el compartimiento de linfocitos B	
VII.3.Efectos de la activación de CD40 en linfocitos proB de médula ósea	
VII.4.Implicaciones de la expresión transgénica de CD154 en la segregación de linajes de linfocitos B y la tolerancia inmunológica	
VII.5.Papel biológico de CD40 en la ontogenia temprana de linfocitos B	
VIII.Conclusiones.	137
IX. Apéndice.	138
Tabla I: Anticuerpos monoclonales utilizados para citometría de flujo	
Tabla II: Análisis del compartimiento de linfocitos B esplénicos	
Tabla III: Análisis ontogénico de la linfopoyesis B en hígado neonatal y médula ósea	
Tabla IV: Niveles de inmunoglobulinas séricas en ratones transgénicos y controles de camada	
X. Bibliografía.	142

Índice de figuras

Figura 1.	Maduración de linfocitos B en médula ósea y bazo de ratón	19
Figura 2.	Vías de señalización del RLB	23
Figura 3.	Identificación de ratones transgénicos fundadores	63
Figura 4.	Linfocitos B en sangre Periférica	65
Figura 5.	Linfocitos B en el bazo	67
Figura 6.	Linfocitos B en el ganglio linfático	68
Figura 7.	Linfocitos B en la médula ósea	70
Figura 8.	Linfocitos proB de la médula ósea	72
Figura 9.	Análisis del compartimiento de Linfocitos T	74
Figura 10.	Células granulomonocíticas	76
Figura 11.	Expresión de CD154 en bazo	78
Figura 12.	Expresión de CD154 en ganglio linfático	80
Figura 13.	Expresión de CD154 por RT-PCR	82
Figura 14.	Análisis histopatológico	84
Figura 15.	Dependencia fenotípica de CD40	86
Figura 16.	Linfocitos B esplénicos I	89
Figura 17.	Linfocitos B esplénicos II	90
Figura 18.	Ontogenia de linfocitos B	92
Figura 19.	Ontogenia de linfocitos B en médula ósea	94
Figura 20.	Caracterización de linfocitos proB	96
Figura 21.	Ciclo celular en linfocitos proB	98
Figura 22.	Expresión de CD40 y CD154	100
Figura 23.	Caracterización fenotípica de linfocitos B esplénicos	102
Figura 24.	Volúmen celular de linfocitos	104
Figura 25.	Análisis del ciclo celular en linfocitos B esplénicos	105
Figura 26.	Linfocitos B en cavidad peritoneal	107
Figura 27.	Niveles relativos de inmunoglobulinas séricas	109
Figura 28.	Respuesta humoral timo-dependiente	111
Figura 29.	Linfopoyesis B en ratones CD154Tg x MD4	114
Figura 30.	Linfocitos B esplénicos de ratones CD154Tg x MD4	116
Figura 31.	Linfocitos B CD5 ⁺ en tres líneas transgénicas diferentes	117
Figura 32.	Expresión de CD5 en linfocitos B del bazo de ratones CD154Tg x MD4	119
Figura 33.	Expresión de CD5 en linfocitos B de la médula ósea I	121
Figura 34.	Expresión de CD5 en linfocitos B de la médula ósea II	122
Figura 35.	Expresión de CD5 en linfocitos preB B220 ^{hi} /CD43 ⁺	123
Figura 36.	Producción de anticuerpos anti-FC	125

Lista de abreviaturas

Td	Antígenos tímo-dependientes
Ti	Antígeno tímo-independientes
CDF	Célula dendrítica folicular
LES	Lupus eritematoso sistémico
LS	Cadena ligera surrogada
IgL	Cadena ligera de inmunoglobulina
IgH	Cadena pesada de inmunoglobulina
CHP	Célula hematopoyética pluripotenciales
TdT	Desoxinucleotidil-transferasa terminal
EICH	Enfermedad de Injerto Contra Huésped
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FC	Fosfatidilcolina
FO	Folicular
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
LPS	Lipopolisacárido
LG	Lisozima de gallina
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
RLB	Receptor del linfocito B
RLT	Receptor de linfocito T
GM-CSF-R	Receptor del factor estimulador de colonias granulo-monocíticas
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
Tg	Transgénico
ZM	Zona marginal

Resumen

Los linfocitos B requieren de al menos dos señales para su activación, expansión clonal y diferenciación a célula plasmática. La primera señal corresponde al reconocimiento antigénico por medio del receptor de linfocitos B; mientras que la segunda señal corresponde a una señal co-estimuladora, proporcionada por el linfocito T CD4⁺ activado. La primera señal, en ausencia de la segunda, induce en el linfocito B un estado refractario a la activación conocido como anergia clonal, la cual es considerada como uno de los mecanismos más importantes en el mantenimiento de la tolerancia contra lo propio. Sin embargo, a pesar de que durante la ontogenia de los linfocitos B la expansión y la inducción de tolerancia también dependen de señales, la naturaleza de éstas, fuera de las de su receptor de antígenos, es aún oscura. En este trabajo, se estudió el papel de la co-estimulación a través del receptor CD40 (segunda señal) en la activación de linfocitos B *in vivo*, así como su papel en la ruptura de la tolerancia inmunológica y las posibles funciones de este receptor durante la ontogenia. Para ello, se generaron ratones transgénicos que expresan constitutivamente CD154, el ligando de CD40, en linfocitos B.

Los ratones transgénicos mostraron expansión del número de linfocitos B periféricos durante las dos primeras semanas de vida, la cual fue seguida de una dramática reducción del número absoluto de linfocitos B periféricos en ratones adultos. Los linfocitos B expresaron marcadores fenotípicos de activación y maduración como IA, Fas, y CD23 en su superficie. Mientras que la generación de linfocitos B en el hígado neonatal se encontró aumentada, la generación de linfocitos B en médula ósea estuvo abatida desde un principio debido a un bloqueo en la transición de linfocitos proB a preB. A pesar de que los linfocitos B tenían fenotipo de activación, los ratones transgénicos fueron hipogamaglobulinémicos y no mostraron autorreactividad. Aunque una gran proporción de los linfocitos B de ratones transgénicos expresaron CD5, estos linfocitos no corresponden al linaje de linfocitos B-1.

En conjunto, nuestros resultados indican el resultado de la activación de linfocitos B a través de CD40 depende de la etapa ontogénica, así como del sitio anatómico en el que ocurre la interacción con CD154. Asimismo, coinciden con la noción de que la activación de ciertos co-receptores modifica la intensidad de la señalización del receptor de linfocitos B, moldeando los repertorios neonatal y adulto.

Abstract

B lymphocytes require at least two sets of signals for their activation, clonal expansion and differentiation into plasma cells. The initial signals are delivered by antigen through the B cell antigen receptor, whereas, the second set is delivered by antigen-primed CD4⁺ T cells. B cells receiving antigenic stimulation without the second signal are rendered unresponsive to further antigenic challenge or clonal anergy, which is one major mechanism for achieving self tolerance. Although during ontogeny, B cell development also depends on the conjugation of signals, their nature, besides those delivered by the antigen receptor, remains largely unknown.

In this work, we studied the role of co-stimulation through the CD40 receptor in B lymphocyte activation *in vivo*, as well as in the breakdown of immunological tolerance and during B cell ontogeny. To achieve this, we generated a transgenic mouse model in which B lymphocytes express constitutively CD154, the CD40 ligand.

CD154-transgenic mice had an expanded peripheral B cell pool during the first weeks of life, followed by a dramatic reduction of peripheral B cells persisting through adulthood. Peripheral B lymphocytes prematurely expressed activation and maturation surface markers such as I-A, Fas and CD23. Whereas B lymphopoiesis in neonatal liver was enhanced, bone marrow B lymphopoiesis was suppressed due to a block during proB to preB cell transition. Despite the activation phenotype of B cells, these mice were hypogammaglobulinemic and with no evidence of autoreactivity. Although many remaining B cells were CD5⁺, these were not of the B-1 subset.

Our results indicate that the outcome of B cell signaling through the CD40 receptor depends on the ontogenic timing and anatomic location where the activation event takes place. They also support the notion that co-receptor activation modifies the intensity of B cell receptor-derived signals, influencing the shape of the neonatal and adult B cell repertoire.

I. Introducción General.

Los linfocitos B son células altamente especializadas en el reconocimiento de antígenos y en la secreción de gran cantidad de moléculas de inmunoglobulina antígeno-específica.

Los linfocitos B, en conjunto, reconocen una gran diversidad de antígenos a través de una inmunoglobulina de superficie denominada receptor del linfocito B (RLB). De acuerdo con la teoría de la selección clonal de Burnet, cada linfocito B expresa en su superficie un RLB con especificidad única, aún antes de haber estado en contacto con un antígeno específico. Ante el encuentro antigénico, el linfocito B es capaz de proliferar, generando progenie cuyo RLB conserva la especificidad original y tiene la capacidad de diferenciarse a célula plasmática, la cual secreta moléculas de inmunoglobulina antígeno-específica. En un individuo sano, aquellos linfocitos cuyo RLB es específico para antígenos propios, son eliminados en fases tempranas de su desarrollo, evitando el desarrollo de patología autoinmune ¹. Después de 50 años se han logrado avances sustanciales en la validación experimental a nivel molecular de cada uno de los postulados de la hipótesis de la selección clonal, tanto para linfocitos B como para linfocitos T.

Asimismo, durante estos 50 años se ha generado conocimiento que sin contradecir los postulados básicos de la teoría de Burnet, la han enriquecido y en conjunto enmarcan los conceptos teóricos sobre los cuales se trabaja en el estudio de la inmunidad adquirida actual. Quizá la mayor aportación en este sentido sea el modelo de activación de linfocitos por dos señales, propuesto para los linfocitos B por Bretscher y Cohn ², generalizado por Lafferty y Cunningham ³, y demostrado por Schwartz y Jenkins en linfocitos T ⁴. El modelo de dos señales para la activación del linfocito propone el requerimiento de una primera señal antígeno-específica a través del RLB o el receptor de linfocitos (RLT) y de una segunda señal antígeno-inespecífica provista directamente por el patógeno (Patrones moleculares asociados a patógenos) o por otra célula (citocinas o ligandos asociados a membrana expresados por células "agredidas") ⁵. La presencia de la primera señal (antígeno) en ausencia de la segunda induce un estado refractario a la activación denominado anergia clonal ⁶.

La presencia de un patógeno en un individuo implica que el linfocito recibirá la señal antigénica y la segunda señal antígeno-inespecífica, también llamada señal co-estimuladora. Un linfocito autorreactivo que no haya sido seleccionado negativamente recibirá la señal del autoantígeno, más no la señal co-estimuladora, entrando así en un estado conocido como anergia clonal. La anergia clonal explica la presencia de linfocitos autorreactivos en individuos sin enfermedad autoinmune. Actualmente se considera que la anergia clonal es un mecanismo complementario a la selección negativa para lograr la tolerancia inmunológica. Teóricamente, la ruptura de la tolerancia inmunológica y el consecuente desarrollo de una patología autoinmune, puede deberse a fallas en la inducción de selección negativa, fallas en la inducción de anergia clonal, o en ambas.

En este trabajo se investigó el papel de la señal co-estimuladora recibida por el receptor CD40 en el desarrollo de autoinmunidad mediada por linfocitos B. Presuponiendo que en condiciones normales, existen clonas autorreactivas que no son seleccionadas negativamente durante la linfopoyesis y que permanecen anérgicas debido a la ausencia de señales co-estimuladoras, nos preguntamos si proporcionando una señal co-estimuladora en forma constitutiva durante la ontogenia de linfocitos B es suficiente para activar clonas autorreactivas causando autoinmunidad.

1.1. Ontogenia de linfocitos B.

La generación de un amplio repertorio de linfocitos B con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier antígeno extraño, respetando el universo antigénico propio, es un proceso complejo y altamente regulado que inicia con la generación de linfocitos proB comprometidos al linaje linfoide B, a partir una célula hematopoyética pluripotencial (CHP). Los linfocitos proB inician los rearrreglos de genes de cadena pesada (IgH) para originar linfocitos preB que expresan el receptor preB compuesto de IgH y la cadena ligera surrogada (LS) constituida por los productos de los genes $\lambda 5$ y VpreB. Estos linfocitos preB se expanden numéricamente a lo cual le sigue el rearrreglo de la cadena ligera (IgL). El rearrreglo de IgL permite el ensamblaje completo del RLB, etapa a la cual se denomina linfocito B inmaduro IgM⁺. Los linfocitos B inmaduros migran hacia el bazo y aquellos cuyo RLB reconoce un

antígeno propio son eliminados física o funcionalmente (selección negativa). Aquellos linfocitos que no fueron seleccionados negativamente recircularán en los órganos linfoides secundarios hasta ser seleccionados positivamente por su antígeno específico⁷. A continuación se detallara dicho proceso.

1.1.1. Generación de precursores comprometidos al linaje B.- Los linfocitos B se generan a partir de una célula hematopoiética pluripotencial de origen mesodérmico. Las CHP se definen por su capacidad de generar células diferenciadas de toda la serie hematolinfoide; por su capacidad de autorenovación (generar progenie con idéntica pluripotencialidad hematopoyética) y por la capacidad de reconstituir toda la serie hematolinfoide después de ser transplantadas en huéspedes irradiados⁸. En hígado fetal y médula ósea de ratón, las CHP se definen con base en la ausencia de marcadores de linaje diferenciado (lin⁻) como CD3, CD19, Mac-1, Ter119, GR-1, ausencia de CD27, así como la expresión de Thy 1, Sca-1, c-kit^{bajo}, MHC-I^{alto}, VLA-4^{9,10}.

En el ratón, la eritropoyesis primitiva comienza en el saco vitelino, alrededor del día 8 de gestación. Los primeros precursores de linfocitos B se detectan en la placenta y circulación embrionarias entre los días 10 a 12 de gestación. La máxima producción de linfocitos B, que expresan RLB (IgM en superficie) en la etapa prenatal, ocurre en el hígado a partir del día 16 de gestación y alcanza su máximo en la etapa perinatal. Posteriormente, la linfopoyesis B continúa en el bazo durante las primeras 2 semanas postnatales. Después de la segunda semana, la médula ósea adquiere la capacidad linfopoyética definitiva en el ratón adulto¹¹.

La diferenciación de la CHP hacia precursores comprometidos a un linaje determinado implica cambios en la regulación de la transcripción genética que generan progenie de potencialidad progresivamente limitada. Recientemente, se han identificado un tipo de célula con potencial restringido a la estirpe linfoide, denominado precursor linfoide común y se define como Lin⁻ IL-7R⁺, Thy-1⁻, Sca-1^{bajo} y c-kit^{bajo}¹². Asimismo, se han identificado diversos reguladores transcripcionales que juegan un papel crucial en la regulación de la expresión de genes propios de cada linaje hematopoyético. Mediante mutagénesis dirigida de estos factores

transcripcionales en ratón, ha sido posible definir la etapa de diferenciación en la que cada factor juega un papel determinante ¹³. A continuación se describen los más importantes para la diferenciación hacia precursores comprometidos al linaje B.

PU.1: Es un factor transcripcional de la familia *ets*. Se expresa en todas las células de origen hematopoyético. Los ratones PU.1^{-/-} mueren en la etapa perinatal y carecen de linfocitos B, T, macrófagos, granulocitos, pero no de eritrocitos ni de megacariocitos, por lo cual se cree que PU.1 es esencial para la generación de precursores de potencial restringido a la serie linfocitoide ^{14,15}.

Ikaros: Es un grupo de 4 proteínas generadas por empalme (*splicing*) alternativo, que pertenecen a la familia de factores transcripcionales con dedos de zinc. Esta familia de proteínas se caracteriza por tener un dominio de unión a DNA, así como dominios de homo y heterodimerización con otros miembros de la familia (aiolos y helios). Ikaros se expresa en toda la serie hematopoyética. La linfopoyesis T y B fetales y la linfopoyesis B adulta en los ratones *ikaros*^{-/-} son deficientes¹⁶. Otro ratón mutante, en el cual *ikaros* carece del dominio de unión a DNA, tiene una ausencia completa de células NK, linfocitos B y linfocitos T. En este modelo, la proteína mutante actúa como dominante negativa que dimeriza con otras proteínas de la familia *ikaros* sin capacidad de unirse al DNA¹⁷. Entonces *ikaros* parece ser necesario para la generación del precursor linfocitoide común lin⁻, IL-7R⁺, c-kit^{bajo}, Sca-1^{bajo}, Thy 1⁺.

E2A: Es un factor transcripcional heterodimérico de la familia bHLH (hélice-asa-hélice básica) compuesto de E12 y E47. Su expresión es ubicua. Los ratones E2A^{-/-} presentan alta mortalidad perinatal, carecen específicamente de linfocitos B y presentan un desarrollo anormal de linfocitos T. E2A se asocia a los enhancers intrónicos 3' de los genes de Ig. Se ha sugerido que E2A es necesario para la inducción de la maquinaria de recombinación de genes de Ig, lo cual es consistente con el hecho de que la ausencia de E2A afecta selectivamente al linaje linfocitoide B y que E2A parece ser indispensable para la generación de precursores linfocitoide B comprometidos ^{18,19}.

EBF: Pertenece a una familia de factores transcripcionales que se expresan en neuronas olfatorias, adipocitos y linfocitos B. EBF sólo se expresa en linfocitos B a lo largo de su maduración, a excepción de las células plasmáticas. EBF es un importante transactivador del gen *mb-1* que codifica para la subunidad $I\alpha$ del RLB. El fenotipo de ratones EBF^{-/-} es muy similar al de ratones E2A, pues carece selectivamente de linfocitos B en estadios de maduración posteriores a la etapa proB y carecen por completo de los primeros rearrreglos D_{II}J_{II} 20

Pax-5: Pertenece a la familia de factores transcripcionales con dominio de unión a DNA llamado *homeodominio parecido*. Esta familia participa en diversos procesos organogénicos y particularmente Pax5 influye en la formación del sistema nervioso central. Pax5 se expresa en linfocitos B a lo largo de todo su desarrollo a excepción de células plasmáticas. Los ratones Pax5^{-/-} carecen de linfocitos B en etapas posteriores a linfocito proB²¹. El bloqueo en la maduración parece ser posterior al observado en mutantes de E2A y EBF, puesto que los linfocitos proB de médula ósea en ratones Pax5^{-/-} si tienen rearrreglos D_{II}J_{II}. Sin embargo, no es posible identificar precursores linfoides B en hígado fetal de ratones Pax-5^{-/-}. Las razones de esta diferencia son aún desconocidas.

El mecanismo por el cual Pax-5 es necesario para la progresión de linfocitos proB a linfocitos preB apenas comienza a entenderse. Pax-5 parece ser necesario para inducir la expresión de CD19, *mb-1*, N-myc y LEF-1^{22,23}. Sin embargo, los linfocitos proB Pax-5^{-/-} en los que han ocurrido rearrreglos D_{II}→J_{II} son capaces de generar diferentes linajes *in vitro*²⁴. La eliminación condicional de Pax5 *in vivo* se asocia con pérdida de linfocitos B maduros y supresión de la expresión de marcadores específicos de linfocitos B, así como la adquisición de marcadores de otros linajes en linfocitos B²⁵. Asimismo, la sobreexpresión de Pax-5 en la línea celular mielóide FDC-P1 reprime la expresión de la cadena α del GM-CSF-R²⁶. Esta evidencia sugiere que el papel más importante de Pax-5 en cuanto al desarrollo de linfocitos B es mantener el compromiso al linaje B al suprimir opciones de diferenciación a otros linajes.

La acción concertada de, al menos, los factores transcripcionales mencionados tiene como consecuencia la generación de precursores que expresan genes propios del linaje B y que perdieron la capacidad de expresar genes necesarios para la diferenciación a otros linajes. Los genes cuya expresión es crucial para el desarrollo de linfocitos B son aquellos que codifican para proteínas efectoras de la recombinación de segmentos $V_{H}D_{H}J_{H}$ y $V_{L}J_{L}$ (por ejemplo TdT, Rag-1 y Rag-2, etc), la cadena ligera surrogada, la cadena pesada del RLB, así como componentes de la maquinaria de transducción de señales derivadas de RLB^{13,27}.

1.1.2. Generación del receptor preB: La identificación del precursor más temprano comprometido al linaje linfóide B se ha llevado a cabo independientemente por diversos grupos. Li, *et al*, proponen que este precursor denominado linfocito pre-proB puede identificarse como células $B220^{bajo}/AA4.1^{+}/CD24^{+}/CD4^{+}$ que expresan transcritos de IgH en configuración germinal (no recombinados) y no expresan las recombinasas *Rag-1*, *Rag-2* ni $\lambda 5$ ²⁸. Utilizando otros marcadores, Rolink, *et al*²⁹, sugieren que el linfocito pre-proB se caracteriza por ser $B220^{bajo}/CD19^{+}/CD4^{+}/NK1.1^{-}$; mientras que Tudor, *et al*³⁰, ha sugerido que el precursor más temprano comprometido al linaje B se caracteriza por ser $B220^{bajo}/CD19^{+}/DX5^{+}/Ly-6C^{+}/CD24^{+}$. Independientemente de los marcadores utilizados, estos precursores tienen la capacidad de generar únicamente linfocitos B al ser transferidos a ratones irradiados, proliferan en co-cultivos con células estromales y son dependientes de IL-7.

La siguiente fase de maduración es la denominada ProB o preB-1 (de acuerdo con Hardy³¹ o Rolink¹¹, respectivamente). Estas células se caracterizan por ser $B220^{bajo}/CD19^{+}/CD43^{+}/c-kit^{-}$, por expresar *Rag-1* y *Rag-2*, desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT, sólo en precursores de médula ósea), la cadena ligera surrogada (LS), $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ ($CD79\alpha$ y $CD79\beta$, productos de la expresión de *mb-1* y *B27* respectivamente), y ya rearreglaron $D_{H}J_{H}$ ^{31,32}. Los linfocitos proB $B220^{bajo}/CD43^{+}$ pueden dividirse a su vez en tres fracciones según la expresión de CD24 y BP-1. La fracción A corresponde a linfocitos $B220^{bajo}/CD43^{+}/CD24^{+}/BP1^{-}$ e incluye a los linfocitos pre-proB descritos anteriormente. La subpoblación $B220^{bajo}/CD43^{+}/CD24^{+}/BP1^{-}$, o fracción B se caracteriza por haber iniciado el rearreglo $D_{H}J_{H}$ en ambos loci. La subpoblación $B220^{bajo}/CD43^{+}/CD24^{+}/BP1^{+}$ se caracteriza por el inicio de rearreglos $V_{H} \rightarrow D_{H}J_{H}$ ³¹.

Los linfocitos proB/preB1 siguen siendo dependientes de contacto con células del estroma y de señales tróficas solubles como IL-7³³, SDF-1³⁴ y unidas a membrana como SCF (*factor Steel*) y su receptor c-kit en el linfocito proB³⁵. Los ratones deficientes (por mutaciones espontáneas o dirigidas) de cualquiera de estos factores o de sus receptores correspondientes, o en los genes que codifican para las recombinasas Rag 1 y 2, el factor transcripcional Pax-5, Ig β , la cinasa de tirosina Syk y del gen $\lambda 5$ causan arresto en la población proB/pre B I^{21, 34, 36-46} (**Figura 1**).

La recombinación V_HD_HJ_H inicia en la fracción C de linfocitos proB y se mantiene en la transición a linfocito proB fracción C' o preB-II grande y son B220^{bajo}/CD43⁺/IgM⁺/c-kit⁻/CD25⁺, son de gran tamaño y más del 60% se encuentra en proliferación. Los linfocitos preB II siguen siendo dependientes de IL-7 pero no dependen más de contacto estromal^{11,31}. Aquellos linfocitos proB cuyo rearreglo V_H→D_HJ_H es productivo (en el marco de lectura correcto) ensamblan y expresan en la superficie el receptor preB, compuesto por 2 μ H y 2 LS (compuestas a su vez por los segmentos VpreB y $\lambda 5$), en estrecha asociación con Ig α e Ig β ^{7,11}.

La etapa preB II es fundamental para el desarrollo del repertorio de linfocitos B. La expresión de Rag 1 y 2, y de TdT se suprime, y aquellos linfocitos que rearreglaron productivamente IgH son inducidos a proliferar a través de un número desconocido de mitosis (selección positiva). Por otro lado, en esta etapa ocurre la exclusión alélica, en la cual se previene el rearreglo V_H→D_HJ_H en el otro locus de IgH, favoreciendo que el linfocito B contenga una especificidad única^{7,11,47,48}.

Los mecanismos que median la expansión proliferativa de linfocitos preB II grandes parecen depender mayoritariamente del ensamblaje correcto de IgH con LS del receptor preB. Los ratones deficientes de cualquiera de los componentes del receptor preB (IgH transmembranal, $\lambda 5$) y moléculas asociadas a su activación (Ig β , y la cinasa de tirosina Syk) carecen de linfocitos preB II, lo cual sugiere que la expansión numérica en esta etapa depende de la expresión y señalización del receptor preB^{44-46,49} (**Figura 1**). Hasta la fecha, no se ha identificado un ligando específico del receptor preB y se ha descrito que los linfocitos proB son

capaces de proliferar *in vitro* en ausencia de células estromales, por lo cual, se asume que el receptor preB señala constitutivamente.^{50,51} Sin embargo, se desconoce si las interacciones de baja afinidad (inespecíficas) entre el receptor preB y ligandos extracelulares contribuyen a esta señalización, de manera análoga a como ocurre en el caso de la interacción entre RLT-MHC durante la selección positiva de linfocitos T en el timo y en linfocitos T periféricos.^{52,53}

En cuanto a los mecanismos que gobiernan la exclusión alélica del locus IgH se conoce muy poco. Un candidato favorito para mediar dicho proceso es el receptor preB⁵⁴. Sin embargo, los ratones deficientes de ambos genes de VpreB o en ratones transgénicos de μ incapaz de asociarse a Ig α y así activar la cascada de señalización, la exclusión alélica es completa.^{55,56} Esto sugiere mecanismos independientes del receptor preB, que probablemente operan aún antes de que inicien los rearrreglos.⁵⁷

La etapa preB II es una etapa particularmente sensible a la inducción de apoptosis. Esta sensibilidad se debe en parte a la supresión de la expresión de genes con actividad anti-apoptótica de la familia *bcl-2*. En ratones deficientes en *bcl-x*, el compartimento de linfocitos preB II está muy reducido. Por el contrario, la sobreexpresión transgénica de *bcl-x* en linfocitos B origina un compartimento preB expandido en número y con linfocitos preB rearrreglados aberrantemente (fuera del marco de lectura). Esto sugiere que el receptor preB provee las señales que rescatan a los linfocitos preB II de apoptosis y permiten seguir con su proceso de maduración.^{58,59} Los signos de esta transición incluyen la supresión de la expresión de LS y el inicio de la transcripción de C κ en configuración germinal (**Figura 1**).

1.1.3. Generación de linfocitos B inmaduros: Expresión del receptor de linfocitos B en superficie.- Después de la expansión proliferativa, los linfocitos preB entran en una fase de reposo denominada linfocito preB II pequeño. Estos linfocitos siguen siendo B220^{bajo}/CD43⁻/IgM⁻/c-kit⁻/CD25⁺, pero de menor tamaño y corresponden a la fracción D de Hardy^{11,31}.

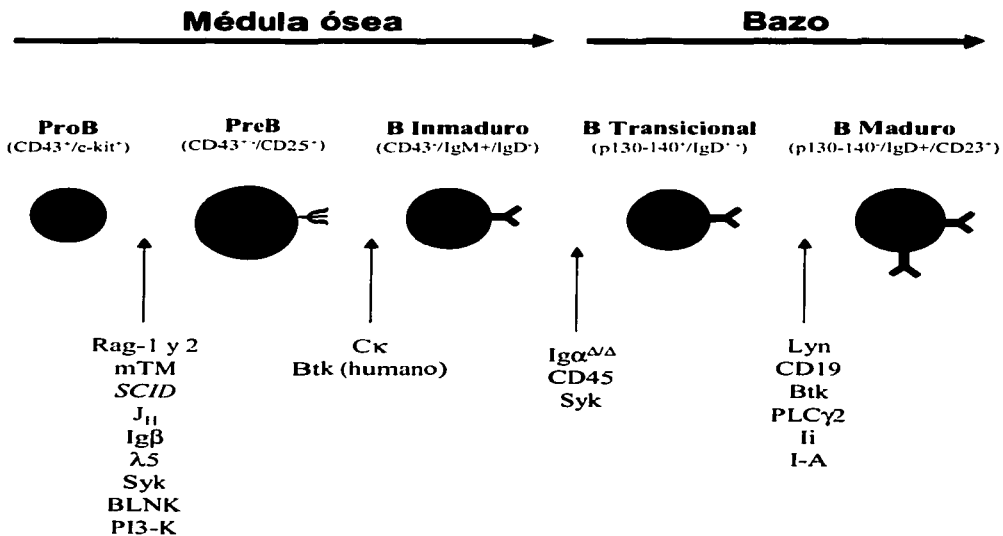


Figura 1. Maduración de linfocitos B en médula ósea y bazo de ratón. Se muestran las principales etapas clasificadas de acuerdo con la expresión de diferentes marcadores de superficie, incluyendo el receptor preB (ψ), IgM en superficie (Y) e IgD en superficie (Y). Todas las etapas mostradas son B220⁺. Abajo se muestran los genes cuyas mutaciones nulas ocasionan defectos en las transiciones indicadas ^{11,48,50,274}.

Los linfocitos preB II pequeños no expresan LS ni TdT, pero reinician la expresión de *Rag-1* y 2. En esta etapa se rearreglan los genes $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ o $V_{\lambda}-J_{\lambda}$.^{11,47} La proporción de linfocitos B que expresan cadenas ligeras κ con respecto a los que expresan cadena ligera λ es de 10:1⁶⁰. Esto se explica en parte porque el locus κ se abre primero que el λ , lo que permite el acceso de factores transcripcionales y recombinasas en una etapa más temprana. La frecuencia de rearreglos productivos de cadena ligera es del doble que el observado para IgH, de tal forma que la mayoría de los linfocitos que rearreglan productivamente un alelo de κ , el otro alelo y el locus λ permanecen en configuración germinal. Aquellos que expresan IgL λ tienen por lo general ambos locus κ con rearreglos no productivos. Entonces, existe una gran flexibilidad en los rearreglos de la cadena ligera en comparación con la del locus de IgH, lo cual se asocia a menor mortalidad celular por rearreglos improductivos en esta etapa.^{48,61,62}

El mecanismo por el cual cada linfocito B expresa un solo alelo de IgL (exclusión alélica), y desde luego sólo un isotipo de IgL (exclusión isotípica) parece depender de su asociación con IgH, lo cual suprime rearreglos posteriores en otros loci.^{61,62} Se desconoce la naturaleza de esta señal o si resulta de la señalización de la recién formada molécula de IgM. La etapa en la cual esta molécula se ancla en la superficie celular se denomina de linfocitos B inmaduros (Figura 1).

1.1.4. Linfocitos B inmaduros: Migración a órganos linfoides secundarios.— Los linfocitos inmaduros se definen fenotípicamente por ser B220^{alto}/CD43⁺/IgM⁺/IgD⁺ pB130-140⁺.^{31,63} Su inmadurez se refleja en su incapacidad para responder a estímulos activadores a través del RLB, ya sea el antígeno específico o el tratamiento con anticuerpos anti- μ .⁶⁴

En el ratón, la producción de linfocitos B inmaduros es de $1-2 \times 10^7$ al día. Los linfocitos B inmaduros de médula ósea tienen una vida media muy corta, lo cual correlaciona con la falta de expresión de *bcl-2*. En esta etapa, los linfocitos B inmaduros migran por vía sanguínea a las zonas extrafoliculares ricas en linfocitos T de los órganos linfoides secundarios.⁷

Los linfocitos B inmaduros recién emigrados al bazo, también llamados linfocitos B transicionales, siguen siendo B220⁺/IgM⁺/pB130-140⁺, característicamente son CD24^{alto}, e inician la expresión progresiva de IgD. Solo un 10 % de los linfocitos B inmaduros generados en la médula ósea es capaz de incorporarse a las zonas extrafoliculares esplénicas como linfocitos B transicionales. El 90 % restante parece ser seleccionado negativamente por auto-antígenos en la médula ósea ^{7.63,65,66}.

Los linfocitos B transicionales ubicados en las zonas ricas en linfocitos T migran hacia el folículo linfoide primario, donde predominan los linfocitos B maduros vírgenes. La migración depende, en parte, de la acción de quimiocinas como MIP-3 β y BCA-1 y se acompaña de maduración progresiva que se refleja con la expresión en superficie de IgD, CD21 y CD23. Este proceso de maduración culmina con la generación de linfocitos B maduros vírgenes foliculares (FO), caracterizados por ser B220^{alto}/IgM^{int}/IgD^{alto}/CD21^{int}/CD23^{alto}/CD24^{bajo}, pB130-140⁺, por tener una vida media larga, estar ubicados en los folículos primarios y tener la capacidad de recircular entre órganos linfoides secundarios en busca de un antígeno activador ^{7.63,65-69}.

I.2. Inducción de la respuesta de linfocitos B maduros.

I.2.1. Componentes del RLB y sus mecanismos de señalización.- El elemento central en el reconocimiento y respuesta del linfocito B en contra del antígeno es el RLB. El RLB se compone de una molécula de IgM de superficie (IgMs), sin capacidad intrínseca de transducción de señales intracelulares. Como se mencionó anteriormente, la IgMs se encuentra asociada a los heterodímeros Ig α e Ig β , los cuales contienen los motivos de fosforilación en tirosina asociados a receptores de activación (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif o ITAM) en sus dominios intracelulares. La agregación del RLB por el antígeno induce la fosforilación de los ITAM de Ig α e Ig β por las cinasas de tirosina de la familia Src Lyn, Fyn y Blk. La fosforilación de los ITAM's de Ig α e Ig β resulta en la activación y el reclutamiento de la cinasa de tirosina Syk, la cual se asocia a los ITAM fosforilados a través de los dominios SH2 de Syk ^{70,71}. La activación de Syk es crucial en la activación del linfocito B a través del

RLB porque participa en la activación de por lo menos tres vías de activación que regulan los procesos de activación, proliferación y diferenciación del linfocito B (Figura 2):

La primera vía de activación resulta en la activación de la cinasa de tirosina de Bruton (Btk), la cual fosforila a la fosfolipasa Cy_2 (PLC_{γ_2}). La PLC_{γ_2} genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol a partir de bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2). El IP_3 induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico al citosol, lo cual resulta en la activación de los factores transcripcionales NFAT, mientras que el PIP_2 activa a la cinasa de proteínas C (PKC), la cual participa en la activación de NF- κ B⁷⁰⁻⁷².

La segunda vía de activación resulta de la activación de Vav, un factor de intercambio de guanina (GEF), el cual activa a la GTPasa Rac-1 en la membrana celular. La conversión de GTP a GDP mediada por Rac-1 participa en la activación de JNK y p38, pertenecientes al grupo de las cinasas MAPK. La activación de esta vía está implicada en la polimerización del citoesqueleto y la polarización o "capping" del RLB^{70,71}.

La tercera vía de activación implica la asociación entre la proteína adaptadora Grb2 con Sos en el citosol y su translocación al complejo RLB-Ig α/β en la membrana. Al igual que Vav, Sos es un GEF y activa a la GTPasa Ras, mediante el intercambio de GDP por GTP. En la membrana, la activación de Ras induce la activación de la cinasa MAP ERK^{70,71}. ERK fosforila al factor de respuesta al suero (FRS) el cual transcribe genes relacionados con proliferación celular, incluyendo *c-fos*⁷³.

La activación de Syk es necesaria, pero no suficiente para el inicio de las vías de activación a través de PLC_{γ_2} , Vav-Rac-1 y Ras. Recientemente se han descrito dos elementos que son cruciales para la activación del linfocito B, pues conectan el complejo RLB-Ig α/β -Syk de la membrana celular con los elementos citosólicos de las diferentes vías. El primero es una proteína adaptadora denominada BLNK (SLP65), que contiene al menos seis residuos de tirosina fosforilables, un dominio SH3 y un dominio SH2. Una vez fosforilada por Syk, BLNK

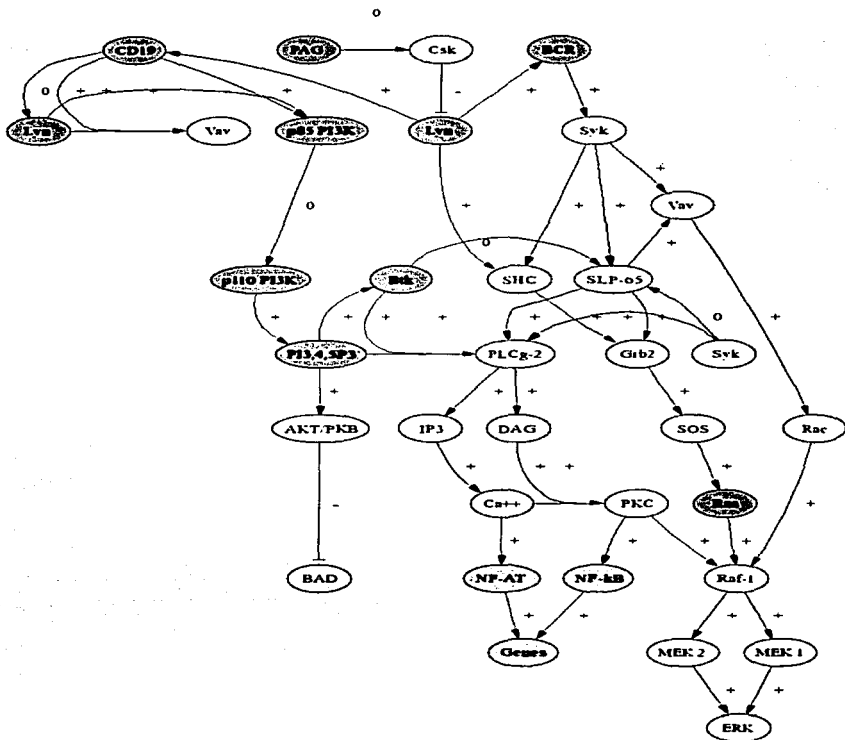


Figura 2. Vías de señalización a través del RLB. El mapa representa un compendio del conocimiento de la señalización obtenido de diferentes especies, principalmente ratón, humano y pollo. Se muestran los efectos estimulatorios (+) e inhibitorios (-). Los colores correlacionan con la topología subcelular de cada elemento: membrana plasmática (naranja), citosol (rosa), y núcleo (morado). Tomado de ²⁷⁵.

se puede asociar a los dominios SH2 de PLC γ 2, Btk y Vav; y al dominio SH3 de Grb2, integrando así los iniciadores de cada una de las vías ^{70-72,74,75}.

El segundo elemento importante en la integración de las vías de activación de PLC γ 2/calcio y Rac-1, es la enzima fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI $_3$ -K). La PI $_3$ -K genera trifosfato de fosfatidil inositol (PIP $_3$) a partir de PIP $_2$. El PIP $_3$ generado por la PI $_3$ -K es el sustrato de unión de los dominios de unión a plekstrina (PH) de Btk, PLC γ 2 y Vav, que les permiten su acercamiento a la membrana celular facilitando la activación de los eventos de activación distales al RLB ^{70-72,74,75}.

La ausencia de la mayoría de los componentes del RLB arriba mencionados, repercute sobre la diferenciación y maduración de los linfocitos B. En términos generales, las mutaciones que afectan componentes proximales de la señalización del RLB, afectan el desarrollo de linfocitos B en fases más tempranas. Asimismo, la deficiencia individual de varios genes afecta la transición de una etapa determinada a otra, sin embargo, el grado de la afectación varía, dependiendo de hasta dónde se puede compensar el defecto. Así pues, la deficiencia de linfocitos B periféricos es más dramática en ratones deficientes de Syk que en ratones deficientes de BLNK o de PI $_3$ -K, aunque las tres mutaciones afectan la misma etapa de maduración ⁷⁶ (Figura 1).

1.2.2. Moléculas co-receptoras asociadas al RLB.- La intensidad de las señales derivadas de la activación del RLB está influenciada por la acción de diversas moléculas co-receptoras que se pueden asociar al RLB durante el contacto antigénico. A grandes rasgos, las moléculas co-receptoras se clasifican en aquellas que amplifican la señal inducida por el antígeno, y en las que inhiben o modulan negativamente la intensidad de las señales inducidas por el antígeno.

El co-receptor estimulador más importante es un complejo formado por CD21 (receptor de C3d o receptor de complemento 2) el cual se encuentra asociado a CD19 y a CD81 (TAPA-1) en forma no covalente. Los antígenos opsonizados por C3d pueden co-agregar el RLB con el

complejo CD21/CD19. Como resultado, CD19 es fosforilado por Lyn, lo cual le permite asociarse con Vav y PI₃-K, potenciando así el reclutamiento de activadores de las vías que inducen la movilización de Calcio intracelular y la activación de las MAPK. El umbral de activación del RLB en linfocitos B de ratones CD19^{-/-} es muy elevado, mientras que el de linfocitos B de ratones que sobreexpresan CD19 es muy bajo ^{75.77-79}.

El co-receptor inhibitorio de linfocitos B más estudiado a la fecha es CD22. CD22 es una lectina asociada al RLB, y presenta afinidad particular por ligandos de carbohidratos α 2-6 sialilados. Característicamente, su región intracelular contiene motivos con residuos de tirosinas fosforilables asociados a inhibición (Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif, o ITIM). Los residuos de tirosinas de los ITIM de CD22 también son fosforilados por Lyn, lo cual permite que la fosfatasa SHP-1 se asocie mediante su dominio SH2 con el ITIM fosforilado. La fosfatasa SHP-1 anclada a CD22 desfosforila a componentes del complejo RLB, cuya actividad depende de fosforilación como Lyn y Syk, frenando la amplificación de las cascadas de señalización. Los linfocitos B de ratones CD22^{-/-} y de ratones deficientes de SHP-1 (motheaten viables o me^v/me^v), presentan un umbral muy bajo a la activación a través del RLB ^{75.78-80}.

1.2.3. Tipos de respuestas inmunes mediadas por linfocitos B: La respuesta de los linfocitos B se puede clasificar, al menos, en dos categorías dependiendo de si requieren o no de la cooperación de los linfocitos T CD4⁺. Las respuestas T-dependientes (Td) se dan contra antígenos de naturaleza proteica, implican un extenso diálogo de señales con el linfocito T antígeno-específico (interacción cognata) y característicamente se generan en estructuras denominadas centros germinales, en donde prolifera una población oligoclonal de linfocitos B en forma dependiente de los linfocitos T y de células endocríticas foliculares (CDF). En los centros germinales, los linfocitos B diversifican su RLB mediante hipermutación somática, cambian de clase C μ a cualquiera de las otras clases C ϵ , C α , o C γ (recombinación de cambio de isotipo) y característicamente generan linfocitos B de memoria y células plasmáticas ^{81,82}.

Las respuestas humorales T-independientes (Ti) son desencadenadas por al menos dos tipos de antígenos: Los antígenos Ti-1 son productos poliméricos repetitivos de origen bacteriano como el lipopolisacárido (LPS) y el péptidoglicano (PG). Característicamente, los antígenos Ti-1 poseen capacidad intrínseca de activación policlonal de linfocitos B. Por su parte, los antígenos Ti-2 son también polímeros, pero carecen de capacidad de activación policlonal intrínseca. Algunos componentes de las paredes bacterianas y las cápsidas de algunos virus que se componen de unidades repetitivas son ejemplo de antígenos Ti-2. Como su nombre lo indica, la generación de las respuestas Ti no requieren de factores derivados de linfocitos T, ocurren normalmente en ratones a tímicos^{n u/nu}, no inducen la formación de centros germinales y no generan memoria inmunológica⁷³.

1.2.4. Respuesta humoral dependiente de linfocitos T: La interacción del antígeno con el RLB específico del linfocito B virgen desencadena tres efectos fundamentales para el inicio de la respuesta humoral T-dependiente: **1)** Endocitosis y procesamiento del antígeno, culminando con la presentación en la superficie celular, de péptidos antigénicos asociados al MHC clase II. **2)** Aumento de la expresión en superficie de moléculas de adhesión como LFA-1; y coestimulación como CD80 y CD86. **3)** Desplazamiento del folículo primario a la interfase entre la zona folicular y la zona de linfocitos T (zona paracortical en ganglio linfático, y capa linfóide periarteriolar en bazo)^{81,82}. La migración a las zonas ricas en linfocitos T es dependiente de la interacción con el antígeno, lo cual sensibiliza al linfocito B a la acción quimioatrayente de las quimiocinas CCL19 y CCL21, mediante la inducción de su receptor CCR7⁸³.

En las zonas T, el linfocito B encuentra al linfocito T pre-activado por la célula dendrítica interdigitante (CDI). En respuesta al complejo MHC/péptido antigénico y a las señales coestimuladoras provistas por el linfocito B, el linfocito T se activa y expresa CD154. La interacción de CD154 con su receptor CD40 en el linfocito B representa un estímulo crucial para la inducción de la respuesta humoral Td. En respuesta a CD154, el linfocito B regresa a la zona folicular y comienza una fase de expansión proliferativa que marca el inicio de la formación del centro germinal^{81,82,84}.

Un centro germinal se genera a partir de 1 a 3 linfocitos B antígeno-específicos activados por linfocitos T. Los linfocitos B proliferantes se denominan centroblastos y se caracterizan por no expresar Ig en su superficie. En roedores, la proliferación de centroblastos genera aproximadamente 1×10^4 células en dos a tres días. En los centroblastos se inicia el proceso de hipermutación somática de los genes VDJ_H y VJ_L y la recombinación para el cambio de isotipo. Después del periodo de hipermutación somática, los centroblastos interrumpen su proliferación generando centrocitos Ig⁺ que se mantienen en contacto estrecho con CDF. Histológicamente, los centroblastos se ubican en un polo del centro germinal conocido como zona oscura, mientras que los centrocitos ocupan el resto del centro germinal, compartimiento conocido como zona clara^{81,82}.

El nuevo repertorio de especificidades generado por la hipermutación somática es sometido a un proceso que selecciona especificidades relevantes de alta afinidad. Los centrocitos son altamente susceptibles a morir por apoptosis, pues no expresan el gen que codifica para la proteína anti-apoptótica *bcl-2* y expresan el receptor inductor de apoptosis Fas, así como los genes pro-apoptóticos p53, c-myc y Bax⁸⁵. La sobrevivencia de los centrocitos depende de la afinidad de su RLB por el antígeno desplegado como complejo inmune (a través de FcR) en la membrana de la CDF. Aquellos centrocitos cuya afinidad por el antígeno disminuyó o se perdió, mueren por apoptosis^{81,82,86}. Los centrocitos sobrevivientes enfrentan dos vías de diferenciación mutuamente excluyentes: La diferenciación hacia célula plasmática; o la diferenciación hacia linfocito B de memoria. Aún no es claro que tipo de señales definen tal elección. CD154 parece inhibir la diferenciación a célula plasmática, favoreciendo su diferenciación a linfocito B de memoria. IL-6 se ha asociado con promover la diferenciación a célula plasmática⁸⁶⁻⁸⁸.

1.2.5. Respuesta humoral independiente de linfocitos T: El reconocimiento de antígenos en la respuesta T_H no involucra procesamiento. Debido a la naturaleza estructural de los antígenos que desencadenan las respuestas T_H, el RLB se entrecruza por el antígeno, iniciando una cascada de eventos intracelulares de activación en el cual CD19 y CD21 (receptor de complemento) juegan un papel importante.

Como consecuencia de la activación por antígenos T_i, el linfocito B forma un foco de proliferación en la interfase T/B y se diferencia rápidamente a célula plasmática. Característicamente, los anticuerpos secretados en la respuesta T_i son de clase IgM (en bazo) e IgA (en tejido linfoide asociado a mucosas), no sufren de hipermutación somática y tienen baja afinidad pero de alta avidez por el antígeno. Como ejemplo de este tipo de respuestas tenemos los llamados "autoanticuerpos naturales" que reaccionan con fosfatidilcolina (FC), fosforilcolina, DNA y en contra de algunos motivos polisacáridicos de diversas glicoproteínas propias (por ejemplo, α Thy 1 (CD90))^{69,88-91}.

La vida media de las células plasmáticas en la respuesta T_i es de unos cuantos días. En comparación con la respuesta T_d, la respuesta T_i es de corta duración pero se induce mucho antes de que se polarice el centro germinal. Entonces, la respuesta T_i representa una primera línea de defensa rápida que eventualmente es sustituida por la respuesta T_d, cuyo desarrollo es más lento^{69,89}.

1.2.6. Subpoblaciones de linfocitos B y su papel en la respuesta humoral: Los linfocitos B vírgenes son una población fenotípicamente heterogénea. En los últimos años se ha progresado mucho en la caracterización funcional de los linfocitos B vírgenes recirculantes (también llamados foliculares, FO), así como de las enigmáticas y controvertidas subpoblaciones no recirculantes de linfocitos B-1 y de zona marginal (ZM). Existe una correlación clara pero no estricta, entre el fenotipo del linfocito, su distribución topológica y el tipo de respuesta derivado del encuentro antigénico (respuesta T_d vs T_i).

Linfocitos B vírgenes foliculares (FO): Constituyen la mayoría de los linfocitos B esplénicos y, como su nombre lo dice, se ubican en los folículos primarios de los órganos linfoides secundarios. Se definen fenotípicamente por ser IgM^{bajo-int}/IgD^{alto}/CD21^{int}/CD23^{alto}. Característicamente, recirculan continuamente a través de los órganos linfoides secundarios hasta encontrar el antígeno y desarrollan, por lo general, respuestas humorales T_d⁶⁹.

Linfocitos B de zona marginal (ZM): Constituyen un 5 a 10 % de los linfocitos B esplénicos. Como su nombre lo indica, se ubican principalmente en las zonas que rodean los folículos y la capa linfóide periarteriolar, denominada zona marginal. Fenotípicamente se definen por ser IgM^{alto}/IgD^{bajo}/CD21^{alto}/CD23^{bajo}. Los linfocitos B ZM no recirculan pero su ubicación en la zona marginal les permite estar en contacto con patógenos que llegan por vía sanguínea, y característicamente desarrollan respuestas T_H rápidas en forma dependiente de complemento (vía CR2 o CD21) ⁶⁹.

Linfocitos B-1: Representa una población minoritaria del bazo (2-3 % del total de linfocitos B) que se encuentra enriquecida en las cavidades peritoneal y pleural. A diferencia de los linfocitos B-2 (principalmente linfocitos FO) derivados de médula ósea, los linfocitos B-1 parecen derivar de precursores linfoides de hígado fetal/neonatal, con capacidad de autorenovación en las cavidades pleural y peritoneal. Fenotípicamente son IgM^{alto}/IgD^{bajo} y dependiendo de la expresión de CD5 se clasifican en B-1a (CD5^{bajo}) o B-1b (CD5⁺). Los linfocitos B-1 producen respuestas típicamente T_H ^{69,91}.

1.3. Selección positiva de linfocitos B.

El uso de genes V_H en linfocitos preB B220⁺/IgM⁺ de médula ósea es diferente al observado en linfocitos B IgD⁺ esplénicos. La diferencia entre el repertorio pre-inmune y el repertorio de linfocitos B maduros recirculantes se debe en parte a los procesos de selección negativa de linfocitos autorreactivos (*ver adelante*). Al igual que el repertorio de linfocitos T, el repertorio inmunológico de linfocitos B también es moldeado a través de procesos de selección positiva mediados por el RLB. El primer evento de selección positiva que sufren los linfocitos B es en la transición proB a preB. Aquellos linfocitos cuyo rearreglo de μ permite asociación con la cadena LS para ensamblar el receptor preB son seleccionados positivamente (*expansión clonal, ver antes*).

Un resultado de la selección positiva en la etapa preB es el uso frecuente del segmento V_H81X en linfocitos B derivados de hígado fetal y su virtual ausencia en linfocitos B derivados de

médula ósea ⁹²⁻⁹⁵. Aparentemente, en los linfocitos preB de hígado fetal que utilizan el elemento V_H81X, se facilita el apareamiento con la cadena LS y son seleccionados positivamente, mientras que aquellos linfocitos preB de médula ósea que utilizan el mismo segmento son seleccionados negativamente. El elemento clave que determina la capacidad de apareamiento parece ser la diversidad de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) inducida por TdT. En el hígado fetal, la ausencia de TdT se acompaña de menor diversidad del CDR3 de V_H81X y por lo tanto, se favorece el apareamiento con LS. Por el contrario, la expresión de TdT en linfocitos preB de médula ósea genera mayor diversidad del CDR3 en V_H81X impidiendo su apareamiento con LS, lo cual resulta en la falla para ensamblar el preRLB y en la falta de selección positiva ^{48, 96-98}.

El análisis del uso de genes V_H y V_L en la subpoblación de linfocitos B-1 ha generado evidencias que apoyan el concepto de selección positiva en linfocitos B. Es común encontrar en los linfocitos B-1 las combinaciones V_H11/V_K9, V_H12/V_K4, que determinan la reactividad con fosfatidilcolina ^{99,100}. Sin embargo, el uso de estas combinaciones es infrecuente en la población de linfocitos B foliculares (B-2). Recientemente se generó un ratón transgénico de Ig derivada de linfocitos B-1 que es específica para azúcares asociados a la glicoproteína Thy 1/CD90 (auto-anticuerpo natural anti-timocito). Los ratones transgénicos Thy 1^{+/+} mostraron una expansión del compartimiento B-1. Sin embargo, en los ratones transgénicos Thy 1^{-/-} no se detectaron linfocitos B-1 que expresaran el idiotipo anti-Thy 1, ni se detectaron anticuerpos anti-timocito en suero. Estos resultados sugieren que en la subpoblación B-1 los linfocitos son seleccionados positivamente por el autoantígeno ¹⁰¹.

Consistente con la idea de que la subpoblación de linfocitos B-1 es seleccionada positivamente por la interacción del antígeno con el RLB, se ha observado en ratones que las mutaciones que elevan el umbral de activación del RLB, se asocian con ausencia selectiva de linfocitos B-1. El ejemplo clásico es el ratón *Xid*, que es producto de una mutación *btk*. La deficiencia de PI3-K (p85 α), BLNK (SPL65), PLC γ 2, PKC β , CD45, Ig α , CD19, y Vav también manifiestan una deficiencia absoluta de linfocitos B-1 ^{50,72}. Por el contrario, las mutaciones de componentes del RLB que causan una disminución de su umbral de activación, se asocian a un aumento en el

número de linfocitos B-1. Tal es el caso de la deficiencia de SHP-1, CD22, CD72, y en ratones que sobreexpresan CD19^{77,78,80,102,103}.

La selección positiva también parece participar en la segregación entre linfocitos B de zona marginal y los linfocitos B foliculares, a partir de linfocitos B transicionales. Los ratones transgénicos con Ig compuesta del segmento V_H81X (derivado de hígado fetal) reactivo con el fosfolípido bacteriano fosforilcolina tienen enriquecimiento de linfocitos B de ZM y una consecuente reducción de linfocitos B foliculares. Tal enriquecimiento no se observa en ratones transgénicos de V_H81X CD19^{-/-} o en *btk*^{-/-}⁹⁸. Por otro lado, los ratones mutantes del factor transcripcional *aiolos* carecen de linfocitos B de ZM. Se piensa que *aiolos* aumenta el umbral de activación del RLB, de tal manera que en los ratones dobles mutantes de *aiolos* y *btk* o CD21 si tienen linfocitos B de ZM¹⁰⁴. En conjunto, estos estudios sugieren que la señalización del RLB/coreceptor CD21 participa en el proceso de selección hacia linfocito B de ZM o FO, a partir de linfocitos transicionales esplénicos recién emigrados^{48,50}.

Otra línea de evidencia que apoya indirectamente la idea de que los linfocitos B inmaduros son seleccionados positivamente deriva de la interrupción de su maduración en diversos modelos murinos que presentan mutaciones nulas en diversos componentes del sistema de señalización del RLB y sus co-receptores. Los linfocitos B cuyo RLB es inactivado en forma condicional mueren rápidamente *in vivo*, lo cual sugiere que la IgM de superficie es capaz de transducir señales tónicas de baja intensidad necesarias para mantenerlos con vida¹⁰⁵. Así mismo, en ratones CD45^{-/-}, *Lyn*^{-/-} y en ratones con Igα de dominio intracelular truncado (Igα^{Δic/Δic}), el desarrollo de linfocitos B se interrumpe en la transición de linfocito B inmaduro de médula ósea a linfocito B transicional esplénico^{48,50} (Figura 1).

En síntesis, diversas evidencias sugieren que ciertos idiotipos presentes en el repertorio pre-inmune son seleccionados positivamente por antígenos, ya sean propios o no, para ocupar posiciones estratégicas en diversos sitios anatómicos que definen el repertorio de los linfocitos B maduros^{69,106}. La modificación del umbral de activación de las señales derivadas del RLB por la mutación de algunos componentes de las cascadas de transducción modifica su selección

hacia determinados compartimientos. Si bien no es estricta, existe una correlación entre aquellas mutaciones que reducen la sensibilidad del RLB al antígeno y una falla de selección positiva hacia la respuesta Ti. Las mutaciones que resultan en hipersensibilidad del RLB al antígeno correlacionan con una exagerada respuesta Td y Ti que en muchos casos resulta en enfermedad autoinmune^{50,77,80}.

1.4. Tolerancia de linfocitos B.

Solo el 30% de los linfocitos B transicionales, o sea 3% de la producción diaria de linfocitos inmaduros de médula ósea, progresa a la etapa de linfocito B maduro recirculante. Una propiedad inherente de los linfocitos B inmaduros es su capacidad de ser tolerizados cuanto interactúan con el antígeno, evitando así el riesgo de autoinmunidad, antes vislumbrada por Erlich como *horror autotoxicus*⁶.

Se conocen tres mecanismos de inducción de tolerancia que operan en la etapa de linfocito B inmaduro: deleción clonal, esto es apoptosis de linfocitos B auto-específicos; anergia clonal o inactivación funcional; edición de receptor o cambio de la especificidad del RLB mediante rearreglos secundarios.

1.4.1. Deleción clonal: La deleción clonal de linfocitos B inmaduros auto-específicos de médula ósea ha sido claramente demostrada en al menos tres modelos de ratones transgénicos de inmunoglobulina específica para un auto-antígeno o neo-autoantígenos.

Nemazee y cols generaron ratones transgénicos de Ig específica para H-2K^b. Debido a que los transgénicos de Ig reareglados previenen la recombinación de genes de Ig endógenos, más del 95% de los linfocitos B en ratones transgénicos de haplotipo H-2K^k son específicos para H-2K^b y se desarrollan normalmente. Sin embargo, los mismos ratones transgénicos con fondo genético H-2K^b carecen de linfocitos B de etapas posteriores a la etapa de linfocito B inmaduro de médula ósea¹⁰⁷.

Goodnow y cols¹⁰⁸ desarrollaron un modelo similar. En este caso, el transgén es específico contra la lisozima de gallina (LG)¹¹⁷. Al igual que el modelo anterior, el desarrollo de linfocitos B es normal y el repertorio es mono-específico. Cuando estos ratones son cruzados con ratones transgénicos para LG transmembranal de expresión ubicua (neo-autoantígeno), el desarrollo de linfocitos B es interrumpido en la médula ósea en la etapa de linfocito B inmaduro¹⁰⁸.

Por último, Weigert y Cols¹⁰⁹ generaron ratones transgénicos de una cadena IgH modificada a partir de IgH que usa el elemento V3H9. Este elemento está altamente representado en hibridomas derivados de linfocitos B de ratones de la cepa autoinmune MRL, y secretan anticuerpos anti-DNA patogénicos. La reactividad de estos anticuerpos por el DNA depende del tipo de IgL al cual se asocia el elemento V3H9. La cadena modificada denominada IgH 76R conserva su reactividad anti-DNA independientemente del tipo de cadena ligera a la que se asocia. En los ratones transgénicos de IgH 76R, el desarrollo de linfocitos B se interrumpe en la etapa de linfocito B inmaduro en médula ósea¹⁰⁹. A diferencia de los dos modelos anteriores, la importancia de este modelo es que confirma la selección negativa de linfocitos autoreactivos contra una especificidad de gran relevancia clínica.

La selección negativa de linfocitos B en médula ósea se apega fielmente a lo postulado por Burnet. Además, recientemente se ha acumulado evidencia suficiente que apoya que la selección negativa de linfocitos B inmaduros autorreactivos también ocurre en los órganos linfoides secundarios, es decir en el mismo órgano donde se llevan a cabo las respuestas inmunes¹³⁹.

La selección negativa en órganos linfoides secundarios ocurre en varias etapas de maduración. En principio, puede ocurrir en la etapa de linfocitos B transicionales en el bazo, en donde el contacto con un autoantígeno previene el ingreso del linfocito al folículo y es eliminado por apoptosis^{110,111}.

Otras formas de delección clonal se dan durante la respuesta inmune y dependen de la activación del receptor pro-apoptótico Fas (CD95), por el ligando de Fas (FasL) expresado por linfocitos T activados. En ratones deficientes de Fas o FasL (ratones *lpr* y *gld*, respectivamente), se acumulan una gran cantidad de células plasmáticas productoras de autoanticuerpos anti-ADN en las zonas de linfocitos T esplénicas. Esto sugiere que en ratones normales, los linfocitos cuyo RLB ha sido desensibilizado por el contacto con autoantígenos, son eliminados por apoptosis inducida vía Fas ¹¹¹⁻¹¹³.

Por último, la selección negativa parece operar nuevamente durante la formación de los centros germinales. Los centrocitos cuyo RLB perdió afinidad o cambió de especificidad por el antígeno debido a hipermutación somática parecen ser eliminados por vía Fas en ausencia de señales anti-apoptóticas derivadas del RLB y del contacto con las CDF ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

1.4.2. Anergia clonal: Un panorama completamente diferente resulta de la generación de ratones dobles transgénicos de Ig anti-LG y LG soluble. En este modelo, los linfocitos B no son clonalmente eliminados en médula ósea y son capaces de poblar los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, estos linfocitos B son incapaces de activarse con el antígeno, aún recibiendo cooperación por parte de linfocitos T. El mismo resultado se obtuvo en modelos con Ig transgénica anti-ADN de cadena sencilla. La falta de respuesta se asocia con una reducción de 20 a 50 veces el número de RLB en superficie y un bloqueo de la fosforilación de tirosinas en $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ con el consecuente bloqueo de la cascada de activación ¹¹⁷⁻¹²⁰.

Se ha postulado que los linfocitos B anérgicos tienen una vida corta, en parte, debido a la falta de señalización del RLB, el cual se encuentra "desensibilizado", de tal forma que eventualmente mueren por apoptosis ¹²¹. Recientemente se describió en el modelo de LG-antiLG linfocitos B anérgicos con vida media larga ¹²². Asimismo, se describió que los linfocitos B incapaces de cambiar de isotipo a IgG tienen una vida media reducida ¹²³. Debido a que gran parte de los estudios de longevidad de linfocitos B anérgicos se han realizado en el modelo de LG-anti-LG (solo expresa IgM), se requiere de modelos más apegados a las condiciones fisiológicas normales para evaluar con precisión la vida media de los linfocitos

anérgicos. El estado anérgico puede ser revertido *in vitro* por señales co-estimuladoras ¹²⁴⁻¹²⁵, pero se desconoce la relevancia de estos hallazgos *in vivo*.

I.4.3. Edición de receptor: Diferentes modelos transgénicos de Ig han evidenciado un tercer mecanismo que coadyuva a la tolerancia de linfocitos B hacia determinantes propios. La edición de receptor consiste en la sustitución de la cadena IgL del RLB autoreactivo por una nueva IgL como resultado del encuentro con el auto-antígeno. Este proceso implica señalización a través del BCR autoreactivo, el cual induce rearrreglos secundarios de los genes IgL mediante *Rag 1* y *2*. El apareamiento de las nuevas IgL con las cadenas IgH genera un RLB con especificidad diferente al original y potencialmente no autoreactivo, permitiendo al linfocito continuar su proceso de maduración ¹²⁶⁻¹²⁸.

En primera instancia, la edición de receptor ocurre durante la transición entre la etapa de linfocito B preB II y el linfocito B inmaduro de médula ósea ¹²⁶⁻¹³². A diferencia de lo que ocurre en linfocitos preB y B inmaduros de médula ósea, los linfocitos B inmaduros transicionales que encuentran un autoantígeno son eliminados por apoptosis ¹³⁰. Se desconoce con certeza si los linfocitos B inmaduros son intrínsecamente más susceptibles de editar su receptor o el microambiente de la médula ósea los protege de apoptosis ¹²⁹⁻¹³⁰. Aunque alguna vez se pensó que el mecanismo de edición de receptor representaba un fenómeno raro o artefactual derivado de la transgénesis, existe evidencia que sugiere que de un 25 a 50% de los linfocitos B maduros derivan de precursores que editaron su receptor ¹³¹⁻¹³².

Recientemente se describió que *Rag-1* y *Rag-2* se expresan en linfocitos B en centros germinales ¹³³⁻¹³⁶. Aparentemente, después de los rearrreglos de IgL que ocurren en médula ósea, la expresión de las Rag decae progresivamente, persistiendo en algunos linfocitos B transicionales y B maduros ¹³⁷⁻¹³⁸. La re-expresión de *Rag-1* y *Rag-2* en linfocitos B de centro germinal genera rearrreglos secundarios de IgL, como lo hacen los linfocitos B inmaduros de médula ósea, lo cual probablemente implica un proceso que prevenga la diferenciación de clonas autorreactivas a células plasmáticas. Además de representar un mecanismo adicional destinado a controlar autoinmunidad, estos hallazgos resaltan la plasticidad con la que se

moldea el repertorio de linfocitos B, representando un buen ejemplo de lo que conocemos como inmunidad adaptativa ¹³⁹.

1.5. Papel biológico del receptor CD40 y su ligando CD154

El receptor CD40 (TNFRSF-5) y su ligando CD154 (CD40L, TNFSF-5, gp39) pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF (TNFRSF) y la superfamilia del TNF (TNFSF), respectivamente ¹⁴⁰⁻¹⁴¹.

Las superfamilias TNFR y TNF se componen de pares ligando-receptor estructural y funcionalmente relacionados. En su conjunto, la interacción entre miembros de estas dos superfamilias juega un papel determinante en diversos procesos biológicos como organogénesis, inflamación, respuesta inmune, apoptosis, y en procesos patológicos como autoinmunidad. La interacción entre CD40 y CD154 está implicada en todos los procesos biológicos antes descritos ¹⁴⁰⁻¹⁴².

1.5.1. El receptor CD40: CD40 se identificó como una molécula presente en la superficie celular de ciertos carcinomas y linfomas B. Rápidamente se encontró que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD40 era capaz de inducir proliferación de linfocitos B *in vitro* ^{140,141}. El receptor CD40 es una proteína transmembranal de tipo I con un peso molecular aproximado de 48 kDa, el cual se encuentra como homotrímero en la membrana celular. La secuencia de aminoácidos entre el dominio extracelular de CD40 humano y el murino es 62 % idéntica. Todos los miembros de TNFRSF contienen en su región extracelular pseudorepeticiones de aproximadamente 40 aminoácidos con seis cisteínas conservadas denominados dominios ricos en cisteínas (DRC) que generan tres puentes disulfuro intracatenarios. La región extracelular de CD40 contiene cuatro DRC. Las asas generadas por los puentes disulfuro están implicadas en la homotrimerización del receptor durante la interacción con CD154 ¹⁴⁰⁻¹⁴².

El receptor CD40 tiene un único paso transmembranal de 22 residuos. La región intracitoplásmica se compone de 61 residuos y se encuentra altamente conservada entre humano y ratón (78% de identidad). Existen dos tipos esenciales de región intracelular en los miembros de la TNFRSF: Los que tienen capacidad de unir proteínas adaptadoras denominadas TRAF (*TNF receptor associated factor*) y los que contienen el llamado dominio de muerte (DD) e inducen apoptosis. La región intracitoplásmica del receptor CD40 pertenece a los receptores con capacidad de reclutar TRAFs y carece de dominio de muerte ¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

1.5.2. Expresión y función de CD40: El receptor CD40 se expresa en una gran variedad de células de origen hematopoyético y no hematopoyético. Dentro de las de origen hematopoyético, CD40 se expresa en células presentadoras de antígeno profesionales como los linfocitos B, los monocitos-macrófagos y las células dendríticas. También se expresa en eosinófilos ^{140,141,143}. Entre las células de origen no hematopoyético que expresan CD40, se encuentran diversos epitelios como el tímico, renal, y queratinocitos. Contribuyendo a su amplia distribución tisular, se ha demostrado que CD40 también se expresa en el endotelio vascular ^{140,141,143}.

Linfocitos B: CD40 se expresa prácticamente en toda la ontogenia del linfocito B por lo cual se consideró hace un tiempo como un marcador de linfocitos B¹⁴⁰. La activación de CD40, ya sea por su ligando natural CD154 o bien con anticuerpos agonistas anti-CD40 o CD154 soluble recombinante, ejerce profundos efectos sobre el estado de maduración y activación del linfocito B, por lo cual es una de las señales co-estimuladoras más importantes para su función. La mayoría de los estudios sobre la función de CD40 en linfocitos B se han llevado a cabo *in vitro* con linfocitos B maduros y en respuesta a la activación policlonal a través del RLB con anti-IgM. Los linfocitos B maduros proliferan vigorosamente en respuesta a la ligación de CD40, lo cual es potenciado con anti-IgM ó IL-4 ^{140, 145,146}.

La activación vía CD40 induce incremento de tamaño, agregación homotípica, expresión de moléculas de adhesión, como las integrinas VLA-4 e ICAM-1; de madurez como CD23 y co-estimuladoras para el linfocito T, como CD80 y CD86 ^{140,143,147}.

El tratamiento de linfocitos B vírgenes con anti-IgM y anti-CD40 también potencia la secreción de Ig. En concierto con diversas citocinas, la activación de CD40 promueve el cambio de isotipo de Ig. Así, el estímulo de CD40 más el de TGF- β e IL-10 promueven el cambio de isotipo hacia IgA e IgG, respectivamente, mientras que en conjunto con IL-4 ó IL-13 promueven cambio de isotipo a IgE. Finalmente, la señal de CD40, en conjunto con IFN γ , promueve el cambio de isotipo a IgG_{2a} ^{140,148-152}.

Una de las funciones más importantes de la activación de CD40 es la de promover la sobrevivencia del linfocito B ^{153,154}. Paradójicamente, la activación del linfocito B vía CD40 induce la expresión de FAS (CD95), haciéndolo sensible a la apoptosis ^{155,156}. La explicación a esta aparente contradicción es que durante la reacción del centro germinal y el proceso de maduración de afinidad, CD40 y Fas promueven eliminación cuando la afinidad del RLB por el antígeno es baja (ya sea por pérdida o cambio de afinidad, o por anergia clonal por contacto previo con autoantígeno). Por el contrario, cuando la afinidad del RLB por el antígeno se incrementa, las señales derivadas de éste sinergizan con las señales anti-apoptóticas de CD40 y el linfocito "útil" cuya afinidad mejoró como consecuencia de la hipermutación somática, es seleccionado positivamente ^{112, 113, 116}.

La importancia de la interacción de CD154 con CD40 para la respuesta inmune humoral timo-dependiente es manifiesta en ratones deficientes de CD40 o de CD154 ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰, así como en humanos con síndrome hiper-IgM ligado al cromosoma X, debido a mutaciones en el gen de CD154 ¹⁶¹⁻¹⁶⁴. En los tres casos ocurre una deficiencia total de respuestas timo-dependientes debido a una incapacidad de generar centros germinales. Como consecuencia añadida, los niveles de Ig de isotipos no-M se encuentran muy bajos o ausentes ¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Interesantemente, los pacientes con síndrome de hiper-IgM ligado al X presentan títulos elevados de auto-anticuerpos IgM, implicando a la interacción CD154/CD40 en el mantenimiento de la tolerancia al promover la eliminación clonal de linfocitos B autorreactivos mediante la inducción de la expresión de Fas ¹⁶⁵.

En humanos, se ha descrito que CD40 se expresa desde los linfocitos proB CD34⁺, CD10⁺, μ citoplásmica⁻. La estimulación *in vitro* con anti-CD40 agonista en esta etapa inhibe la proliferación dependiente de IL-7¹⁶⁶. En ratones, mediante el uso de CD154 soluble se describió que CD40 se expresa en linfocitos preB B220⁺/IgM⁻ pero no en linfocitos proB B220⁺/CD43⁺. Sin embargo, los linfocitos preB murinos no proliferan en respuesta a la adición de IL-4 ni expresan CD23 en respuesta al tratamiento con anti-CD40 *in vitro*¹⁶⁷. Interesantemente, los linfocitos preB derivados de ratones transgénicos con expresión constitutiva de *Bcl-2* en linfocitos B expresan niveles altos de CD40, proliferan en respuesta a IL-4 y expresan CD23 en respuesta anti-CD40 agonista *in vitro*¹⁶⁷. Estos resultados sugieren que la activación de linfocitos B vía CD40 en etapas tempranas de la ontogenia, puede resultar en efectos opuestos a lo observado en etapas más tardías de maduración.

Células dendríticas: La expresión de CD40 en células dendríticas ha sido bien caracterizada y es fundamental para iniciar las vías que terminan en la activación de linfocitos T CD4⁺.

En humanos con síndrome hiper-IgM y en ratones deficientes de CD154 ha sido claramente documentado que, además de la deficiente respuesta humoral antes descrita, hay una activación deficiente de la respuesta mediada por células T CD4⁺, lo cual se manifiesta en humanos como una alta morbilidad por patógenos oportunistas como *Pneumocystis carinii* y *Cryptosporidium* sp, y en ratones, por la incapacidad de responder contra antígenos proteicos¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Las evidencias actualmente disponibles indican que la deficiencia en la inmunidad celular asociada a la deficiencia de CD154 se debe al bloqueo de al menos dos funciones de la activación de CD40 en células dendríticas: La primera es la inducción de maduración y migración a ganglio linfático en respuesta al antígeno para activar (prime) a linfocitos T CD4⁺. La segunda es la capacidad de inducir la expresión de citocinas como IL-12 y TNF α , así como moléculas co-estimuladoras para linfocitos T, como son CD80 y CD86¹⁷²⁻¹⁷⁵.

Monocitos /macrófagos: La expresión de CD40 es débil en monocitos, pero aumenta en respuesta a la activación con GM-CSF, IL-3 e IFN γ . En respuesta a la activación a través de

CD40, los monocitos y macrófagos secretan diversas citocinas como IL-6, TNF α , IL-12, quimiocinas como IL-8 y MIP-1 α , y moléculas co-estimuladoras transmembranales como CD80 y CD86^{143,176}. La expresión de estas moléculas es importante para la activación y diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia la vía Th-1. Adicionalmente, la activación de monocitos/macrófagos vía CD40 incrementa la producción de óxido nítrico para la eliminación de patógenos intracelulares. Concordante con lo anterior, la deficiencia de CD40 resulta en incapacidad de resolver infecciones intracelulares como la leishmaniasis¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

De especial interés biomédico resulta la expresión de CD40 en la microglia. La activación de CD40 en sistema nervioso central ha sido implicada en la patogenia de diversos procesos inflamatorios como la enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple, entre otros¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Células de origen epitelial: Se ha detectado expresión de CD40 en epitelio tímico, epitelio renal y queratinocitos. El epitelio tímico secreta GM-CSF en respuesta a la activación de CD40¹⁸². Además, la interacción CD154/CD40 ha sido implicada en la selección negativa en timocitos¹⁸³. Por su parte, la activación por medio de CD40 en queratinocitos resulta en la producción de IL-8, IL-6, TNF α y la expresión de CD54 (ICAM-1), así como en la inhibición de la proliferación y la inducción de su diferenciación¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

Células endoteliales: Las células endoteliales expresan moléculas implicadas en la adhesión y trans migración de leucocitos hacia los sitios de inflamación como lo son CD54, selectina E (CD62E) y VCAM-1 (CD106). Recientemente se ha implicado a la interacción CD40 con CD154 en la inducción del proceso inflamatorio asociado a aterogénesis (*ver adelante*)¹⁸⁶⁻¹⁸⁷.

214

1.5.3. Activación y vías de señalización a través de CD40: La activación del receptor CD40 en respuesta a la interacción con CD154 desencadena diversas vías de señalización involucradas en proliferación y resistencia a apoptosis. Entre las vías más importantes destacan la vía de NF- κ B y JNK/SAPK, aunque también se han involucrado las vías de p38, PI₃-K y

ERK/MAPK. La cooperación entre estas vías en respuesta a la activación vía CD40 resultan en la activación de factores transcripcionales como NF- κ B, AP-1, y ATF2, los cuales participan en la inducción de expresión de diversos genes involucrados en adhesión, quimiotaxis, co-estimulación de células T, progresión del ciclo celular, bloqueo de apoptosis e inducción de diferenciación, entre otros ¹⁸⁷⁻¹⁹².

Como se mencionó anteriormente, la región intracitoplásmica del receptor CD40 carece de actividad enzimática. La interacción entre el trimero de CD40 con el trimero de CD154 reubica al complejo CD40 a los microdominios ricos en colesterol de la membrana plasmática (*rafts*). La interacción CD40-CD154 induce un cambio conformacional en el dominio intracitoplásmico de CD40, lo cual permite su asociación con las proteínas TRAF. Se ha demostrado que al menos cinco de los seis TRAF conocidos hasta la fecha, TRAF 1, 2, 3, 5 y 6 pueden interactuar con CD40, siendo TRAF 2 y 6 los más importantes. Debido a que muchos de estos estudios se han realizado a través de sobre-expresión, queda por definir la participación de cada TRAF en condiciones normales. Asimismo, se desconoce la participación de los 5 TRAF en tiempo, por etapas ontogénicas y por tipo celular ^{144, 193-198}.

Se han realizado muchos estudios para comprender cómo la interacción TRAF-CD40 conecta con las vías distales de activación. TRAF 2 y TRAF 6 promueven activación de NF κ B. TRAF 2 es necesario para la activación de JNK. La activación de linfocitos B de ratones deficientes de TRAF 3 en respuesta a la activación vía CD40 es normal, sugiriendo que TRAF 3 no es indispensable para la activación de linfocitos B dependiente de CD40 ^{143, 144, 198-200}.

I.5.4. El ligando de CD40: CD154: La molécula CD154 murina es una glicoproteína transmembranal homotrimérica de tipo 2, constituida por 260 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 39 kDa (por monómero), codificada en el cromosoma X, tanto en humano como en ratón. La región intracitoplásmica (NH₂-terminal) se compone de 22 aminoácidos. La región transmembranal se compone de 24 aminoácidos y la región extracelular que une al receptor CD40 se compone de 214 aminoácidos. La molécula completa

muestra 78 % de identidad con su ortólogo humano, siendo las regiones intracelulares y las transmembranales las más conservadas entre ambas especies ^{140,142}.

CD154 pertenece a la superfamilia del TNF. Muestra entre un 25 y 30 % de similitud con diferentes miembros de la SFTNF y como tal, se auto-ensambla en forma no covalente como homotrímero simétrico. Cada cadena individual presenta 10 pliegues β antiparalelos que determinan la estructura en "rollo de jalea" característico de los miembros de la SFTNF y en las cápsides de algunos virus. El sitio de unión al receptor CD40 está conformado por una hendidura central conformada por los tres monómeros ^{140, 142, 201}.

I.5.5. Expresión y función de CD154: A diferencia del receptor CD40, la expresión de CD154 se restringe principalmente a linfocitos T CD4⁺ activados, aunque también ha sido descrita en linfocitos T citotóxicos, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos B activados, células dendríticas, plaquetas, mastocitos y células endoteliales ^{140,141,143,202-204}.

En linfocitos T, la expresión de CD154 se regula a nivel transcripcional. Dos horas después de la estimulación del RLT con anti-CD3, se detecta CD154 en superficie, la cual alcanza un pico máximo entre las 8 y 12 horas post-activación y luego decrece a niveles basales a partir de las 24 horas. La inducción transcripcional del gen de CD154 depende de la vía de activación del RLT a través de NFAT, lo cual es potenciado considerablemente por señales derivadas de la activación de CD28 y CD2 ²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Resulta evidente que la función de CD154 está estrechamente vinculada a la función receptor CD40 descrita anteriormente, lo cual se manifiesta en la similitud fenotípica entre ratones deficientes de CD40 y CD154 ¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Si bien la región intracitoplásmica de CD154 no tiene similitud a ninguna molécula con capacidad de transducción de señales conocida, existe evidencia obtenida *in vivo* e *in vitro* que sugiere que CD154 tiene capacidad de transducir señales *per se* ²⁰⁸⁻²¹¹. Sin embargo, esto aún no ha sido confirmado y se desconocen sus implicaciones para la respuesta inmune.

1.6. La interacción CD40-CD154 en procesos patológicos.

Debido a la amplia distribución celular del receptor CD40 y a los profundos efectos inmunológicos e inflamatorios derivados de la interacción con su ligando, la participación de este par de moléculas en diversos procesos patológicos es altamente relevante.

La interacción CD154-CD40 interviene prácticamente en cualquier proceso inflamatorio al mediar la secreción de factores inflamatorios, factores quimiotácticos, y la activación de macrófagos, endotelios y epitelios. No es de extrañarse entonces que el bloqueo de la interacción de CD40 con CD154 resulte en una atenuación considerable de la patología en modelos murinos de enfermedades inflamatorias crónicas como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer^{179-181,212-213}.

Cada vez es más evidente que la formación de placas ateromatosas se asocia íntimamente con el desarrollo de un proceso inflamatorio vascular. Nuevamente, la interacción entre CD40 y CD154 en el endotelio vascular, los monocitos y el músculo liso vascular parecen jugar un papel preponderante en el componente inflamatorio de la aterogénesis^{186,203,214}.

De acuerdo con su importante papel como mediador inmunológico, el bloqueo de la interacción entre CD40 con CD154 se ha utilizado con éxito en la prevención y tratamiento del rechazo agudo y crónico de aloinjertos de islote pancreático, corazón, riñón y enfermedad de injerto contra huésped en modelos experimentales²¹⁵.

Además de su participación en la amplificación de la respuesta inflamatoria en los diversos procesos patológicos mencionados, la interacción entre CD40 y su ligando ha sido implicada en la ruptura de la tolerancia inmunológica. Como se mencionó anteriormente, la selección negativa de timocitos autorreactivos depende parcialmente de interacción de CD154/CD40¹⁸³. En el caso de la eliminación de linfocitos B autorreactivos, ambas señales, a través de Fas y de CD40, son necesarias¹¹³. En humanos con síndrome hiper-IgM ligado al X presentan una elevada frecuencia de autoanticuerpos. Debido a la deficiencia de CD154, estos anticuerpos no son patogénicos pues son IgM y no presentan hipermutación somática, pero claramente indican que existe un defecto en la selección negativa de los linfocitos B¹⁶⁵.

En el lupus eritematoso sistémico (LES) se presenta una gran cantidad de autoanticuerpos de clase IgG con hipermutación somática. Las personas que padecen lupus activo, presentan una elevada frecuencia de linfocitos B y linfocitos T con fenotipo de activación. La expresión aberrante de CD154 en linfocitos T y B en algunos pacientes con LES ha sido descrita, por lo cual se ha sugerido que además de participar en el fenómeno inflamatorio (vasculitis y nefritis lúpica), la interacción entre CD40 con CD154 está involucrada en la activación y expansión de clonas de linfocitos B autoreactivos ²¹⁶⁻²¹⁸.

II. Planteamiento del Problema.

El modelo de las dos señales para la activación de linfocitos B predice que un linfocito se activará al recibir una señal antígeno-específica (Señal 1) más una segunda señal antigéno-inespecífica (Señal 2). Asimismo, predice que en condiciones normales, un linfocito periférico que recibe únicamente la señal del antígeno, pero no la señal antigéno-inespecífica entrará en un estado refractario a la activación denominado anergia clonal^{4,6}.

La anergia clonal se propone como un mecanismo complementario a la tolerancia central, en el cual el linfocito no maduro es eliminado al interactuar con un autoantígeno en el órgano linfoide primario. Presupone que fuera del órgano linfoide primario existen autoantígenos diferentes a los encontrados en el órgano linfoide primario y que al no haber segundas señales, los linfocitos autorreactivos entrarán en anergia clonal, previniendo así el desarrollo de autoinmunidad⁶.

Sin embargo, durante una respuesta inmune en contra de agentes infecciosos se generan gran cantidad de señales coestimuladoras, que teóricamente pueden co-estimular a linfocitos B autorreactivos en vecindad. En esta situación, se reuniría el linfocito B autorreactivo, el autoantígeno y la señal co-estimuladora, dando como un probable resultado la activación del linfocito B autorreactivo y por lo tanto, autoinmunidad. Tal posibilidad es factible y ha sido demostrada para linfocitos T autorreactivos en modelos murinos transgénicos²¹⁹⁻²²⁰.

Si bien, ciertas patologías infecciosas han sido asociadas con el desarrollo tardío de patología autoinmune, en la mayoría de los episodios infecciosos no se desarrolla patología autoinmune. Esto sugiere que en tales casos, la prevención de patología autoinmune obedece a sistemas adicionales de regulación que mantienen suprimidos a linfocitos autorreactivos que han recibido la señal 1 y la señal 2. Siendo la señal de CD40 un co-estímulo muy importante para la activación del linfocito B, nos preguntamos si la activación constitutiva de CD40 en linfocitos B *in vivo*, es suficiente para prevenir la inducción de tolerancia inmunológica de linfocitos autorreactivos, al prevenir la inducción de anergia clonal.

III. Hipótesis.

La señal de activación vía CD40 proporcionada por la interacción con CD154, activa y rescata de apoptosis clonas de linfocitos B autorreactivas que en condiciones normales son eliminadas por los mecanismos de inducción de tolerancia inmunológica.

IV. Objetivos.

- 1) Generar un modelo murino transgénico en el cual los linfocitos B expresen CD154 y se puedan activar entre sí a través de CD40.
- 2) Analizar las consecuencias de la activación de CD40 en linfocitos B *in vivo* en términos de maduración, activación y ruptura de la tolerancia inmunológica de linfocitos B.

V. Materiales y Métodos.

V.1. Obtención de secuencias para la construcción del transgén: Con el fin de lograr expresión del transgen de manera restringida a la estirpe de linfocitos B, se utilizó un elemento quimérico de 1.6 kb obsequiado por la Dra U. Storb (University of Chicago), que se compone de 0.9 kb del enhancer intrónico de la cadena L κ (*iE κ*) en la región 5', ligado a un fragmento de 0.7 kb de la región 5'. El sitio *Hind* III en la posición 429 del promotor *V κ 167* fue eliminado previamente por José Moreno mediante digestión parcial con *Hind* III y rellenado con el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN II seguido de religación. La anulación de este sitio *Hind* III permite obtener en un solo fragmento de 1.6 kb la fusión *E κ /V κ pr* con *Hind* III y alguna de las enzimas del sitio de clonación múltiple de pUC13 (*Xba* I, *Bam*HI).

Debido a problemas prácticos con la transformación de la cepa de *E. coli* DH5- α con el plásmido *p κ en/V κ pr*, se subclonó el fragmento *Hind* III-*Bam* HI correspondiente a la fusión *E κ /V κ pr* en el vector pBluescript II KS (Stratagene, CA), digerido con las mismas enzimas. Lo anterior permitió la producción de plásmido a gran escala y aumento la diversidad de sitios de restricción para obtener el inserto completo.

El ADNc de CD154 murino fue originalmente clonado por Armitage, *et al*²²¹ a partir de una genoteca de expresión generada con ARN de células del timoma murino EL4, seleccionando clonas con una fusión entre la región extracitoplásmica de CD40 y la fracción constante de IgG humana. El marco de lectura está compuesto por 790 nucleótidos que codifican una glicoproteína transmembranal de tipo II con 260 aminoácidos y un peso molecular de 39 kDa.

La secuencia del ADNc de CD154 utilizada para generar el transgen fue obtenida a partir del plásmido p γ CD40L donado por el Dr. Michel Berton (University of Arizona). Dicho plásmido fue generado para expresar el gen de CD154 en baculovirus²²². Esta clona fue obtenida mediante amplificación por PCR y el autor mutó la secuencia descrita por Armitage, *et al*²²¹ (Genebank # X65453) al introducir, con fines de clonación, un sitio *Nco* I en la posición del codón de inicio, cambiando la Ile por Val en la 2ª posición. Asimismo, detectamos que el sitio

de corte *Bam* HI (posición 365, Genebank # X65453) no existía, implicando una mutación en ese sitio.

Con el fin de identificar mutaciones adicionales, se secuenció la clona completa por el método de Sanger en la **Yale university DNA Sequencing Core facility**. El análisis de la secuencia reveló que el sitio *Bam* HI (365) se perdió por una mutación T por C en la posición 366. Sin embargo, también se detectó una mutación de T por G en la posición 605, lo cual implica un cambio de Ile (AUU) por Ser (AGU) en el dominio extracelular, esto es, en la región de unión al receptor CD40.

Debido a que la clona del Dr Berton difiere en dos aminoácidos a la descrita por Armitage, y tales diferencias no habían sido descritas y no se conocía la repercusión que esto pudiese tener *in vivo*, se decidió mutagenizar la clona de Berton, de acuerdo con la secuencia original reportada por Armitage, *et al*²²¹.

Con el fin de corregir las mutaciones y posteriormente poder expresar CD154 *in vitro*, la secuencia correspondiente al cDNA de CD40L (Berton) se subclonó en pcDNA3 (Invitrogen): El plásmido p_γCD40L fue digerido con *Nco* I y rellenado con Klenow con el fin de hacer el extremo 5' romo. Posteriormente, se digirió con *Xba* I liberando un fragmento de 800 pb el cual fue ligado al vector pcDNA3 en los sitios *Eco* RV y *Xba* I. Este plásmido se denominó pcDNA-CD40L.

Una vez en pcDNA3, se procedió a realizar mutagenesis mediante PCR. Para tal fin, se diseñaron cuatro oligonucleótidos. El primer oligonucleótido o *RIso*, 5'-GGA ATT CTG CAG ATC ATG ATA GAA ACA-3' contiene un sitio *Eco* RI (subrayado) y las 8 bases correspondientes al sitio de multiclonación de pcDNA3 y los primeros cuatro codones del cDNA de CD40L de acuerdo con Armitage, esto es, anulando el sitio *Nco* I y mutando la Val por Ile en la segunda posición (negritas). El segundo oligonucleótido o *ISOSER*, 5'-CTC TCA GAT CCA ATG CTG GGC TTC AGC C-3' comprende la secuencia antisentido de la posición 589-617, de acuerdo con Armitage, corrigiendo así, la mutación en la posición 605 (subrayado). El tercer oligonucleótido o *SerIso*, 5'-GGCTGAAGCCCAGCAITGGATCTGA

GAG-3' comprende la secuencia en sentido (+), complementaria al oligonucleótido *IsoSer*, esto es la posición 589-617 de la secuencia de Armitage. Por último, el cuarto oligonucleótido o *Xiut*, 5'-GGGCCCTCTAGAACAGCGCACTGTTCA-3' comprende la secuencia antisentido de la posición 807-792 de la clona de Armitage, que corresponde al codón de término (negritas) y a 12 nucleótidos de la región 3' no traducida. También incluye el sitio de restricción para *Xba* I (subrayado).

Se realizaron por separado dos reacciones de PCR compuestas de amortiguador de *Pfu* 1X (Stratagene, CA) 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cada uno de los dNTP, y una mezcla de 4 U de polimerasa *Pfu* (Stratagene) con 1 U de polimerasa Taq (Gibco, UK) y los oligonucleótidos *Riso* e *IsoSer* (0.2 μM cada uno) y *SerIso* y *Xiut* (0.2 μM cada uno), respectivamente. Como ADN molde se utilizó pcDNA3-CD40L a una concentración final de 40 ng/ml. Los productos obtenidos (610 y 224 pares de bases, respectivamente), se purificaron por electroelución (*ver adelante: V.3. Generación de ratones transgénicos*), se mezclaron en proporción equimolar y se sometieron a una segunda ronda de amplificación por PCR utilizando *Riso* y *Xiut*, bajo las mismas condiciones que en la primera ronda. El producto de PCR obtenido fue clonado en pcDNA3 (pcDNA3-CD40Lwt) y en pBS KS II (pBSKS-CD40Lwt) en los sitios *Eco* RI y *Xba* I. La sustitución de G por T en la posición 605 y el segundo codón corregido, se confirmó por secuenciación de Sanger.

V.2. Construcción del transgén: La construcción de transgenes a partir de ADN genómico utiliza los elementos reguladores que componen el gen en cuestión, esto es intrones y la región 3' no traducida que incluye la señal de poliadenilación, elemento que induce la maduración del ARNm.

Para obtener buenos niveles de expresión de un transgen de ADNc, es necesario incluir en la construcción, además de un promotor, por lo menos un intrón y una región 3' no traducida que contenga la señal de poliadenilación. Estos elementos son, por lo general, heterólogos y muchos investigadores que utilizan transgenesis como estrategia experimental los integran en "cassettes".

Para construir nuestro transgen, y por sugerencia de el Dr. G. Gudice, se solicitó a la Dra Elaine Fuchs de la universidad de Michigan un *cassette* denominado pK14 β derivado del pGemZ3 (Promega) que contiene 2 kb correspondientes al promotor de la queratina 14 humana, un intrón de la globina β humana y sitios *Bam* HI y *Xba* I de clonación de cDNA, y la región 3' no traducida de la queratina 14 humana²²³.

La estrategia para construir el transgen consistió en sustituir el promotor de queratina 14 por el Ei/prV κ , y ligar el cDNA de CD154, en los sitios *Bam* HI y *Xba* I. La sustitución del promotor de queratina 14 por el promotor Ei/prV κ para generar la construcción pEi/prV κ β se realizó mediante digestión con *Ava* I y recuperación de el fragmento 4 Kb correspondiente al *cassette* sin promotor. Paralelamente, el Ei/prV κ fue obtenido de pBSII-Ei/prV κ mediante digestión con *Hind* III y *Xba* I. Ambos, el inserto Ei/prV κ y el *cassette* fueron tratados con Klenow para generar extremos romos y fueron ligados con T4 ligasa. La orientación correcta del inserto se determinó mediante digestión con *Pvu* II, la cual genera cuatro fragmentos de 2.36, 1.7, 0.86 y 0.65 Kb, a diferencia de cuatro fragmentos de 2.36, 2.4, 0.65 y 0.16 Kb cuando la inserción ocurre en la orientación contraria.

Para ligar el ADNc de CD154 en pEi/prV κ β se digirió pBSII-CD40L WT con *Eco* RI y se rellenó con Klenow para generar un extremo 5' romo. A continuación, se obtuvo el fragmento de 0.8 kb con *Xba* I, el cual se insertó en los sitios *Bam* HI (rellenado con klenow) y *Xba* I del *cassette* pEi/prV κ β . La construcción final denominada pEi/prV κ β -CD40L tiene una longitud de 6.37Kb. El transgén, cuya longitud es de 3.67 Kb se obtiene mediante digestión con *Eco*RI y *Hind* III.

V.3. Generación de ratones transgénicos: Se digirió 30 μ g del plásmido pEi κ /V κ pr-CD40L con *Eco* RI y *Hind* III. La digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y el fragmento correspondiente al transgén (3.7 Kb) fue escindida del gel con una navaja e introducida en membrana de diálisis SpectraporeTM (punto de corte de 12-14,000) sellada con pinza en un extremo. Se agregó 1 ml de amortiguador TBE 1x en el interior de la bolsa de diálisis por el extremo libre y se cerró removiendo burbujas de aire. La bolsa de diálisis se colocó en una cámara de electroforesis a la cual se le aplicó una corriente de 50 mA por 30

minutos. Al término, se invirtió la polaridad de los electrodos y se aplicó una corriente de 50 mA por 1 min. El amortiguador con el DNA eluido se colectó, se precipitó con 0.1 vol de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 3 vol de etanol absoluto y se resuspendió en 1 mL de amortiguador L (NaCl 200mM; Tris 20 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM; agua destilada libre de pirógenos, Gibco BRL).

Para purificar el ADN para microinyección, una columna Elutip-d (Schleicher & Schuell) se lavó con 2 mL de amortiguador H (NaCl 1M; Tris 20 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM en agua destilada libre de pirógenos, Gibco), seguido de un segundo lavado con 5 mL de amortiguador L. A continuación se aplicó en la columna 1 mL del ADN en amortiguador L y se lavó con 3 mL de amortiguador L. Para eluir el DNA, se aplicó en la columna 0.4 mL de amortiguador H seguidos de 0.1 mL de amortiguador H adicionales. El eluato se mezcló con 2 vol. de etanol absoluto, se precipitó por centrifugación a 25,000 g a 4 °C durante 1 hr y se resuspendió en 80 µL de amortiguador de inyección (Tris 10 mM, pH 7.4; EDTA 0.1 mM).

Con el fin de eliminar sales de la preparación se dializó el ADN en filtro Millipore™ de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.05 µm (VMWP 01300) contra 5 mL de amortiguador de inyección durante 20 min. Este proceso de diálisis se repitió 2 veces más, cambiando el filtro y el amortiguador en cada ocasión. La muestra dializada se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se diluyó a una concentración final de 5 ng/µl. Una vez diluida, la muestra se filtró con filtro Millipore™ SJHV de 0.45 µm y se guardó a 4 °C. Esta preparación fue utilizada para microinyectar cigotos de ratón (C3H x C57BL/6)_n.

V.4. Genotipificación de ratones transgénicos: Para extraer DNA genómico se obtuvo con tijera iris un fragmento terminal de 0.5 cm de la cola de ratones de 10 a 15 días de nacidos. Para evitar contaminación genómica, la tijera fue lavada con hipoclorito de sodio concentrado entre ratón y ratón.

Cada fragmento de cola se colocó en viales de microcentrifuga de 1.5 mL, se les agregó 500 µL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; NaCl 400 mM; EDTA 10 mM, pH 8.0; SDS 1%), 25 µL de proteinasa K (25 mg/ ml, Boeringer Mannheim) y se incubaron a 56 °C por

10-16 h. Posteriormente, los tubos se enfriaron en hielo por 5 min y se les agregó 200 μ L de solución de precipitación (NaCl 6 M), se mezcló y se centrifugó a 13,000 rpm a 4 ° C durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un segundo tubo limpio, se agregó 1 mL de etanol absoluto y el DNA se precipitó por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. El sedimento se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y se resuspendió en 300 μ L de dH₂O autoclaveada.

La identificación de fundadores se realizó por hibridación de Southern. 10 μ g de DNA genómico se digirieron con *Nco* I y *Xba* I a 37 ° C toda la noche. Cada digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham) en solución de NaOH 0.4 N por toda la noche. Después de la transferencia la membrana se lavó en SSC 2x (NaCl 0.3 M, Citrato trisódico 30 mM) y se pre-hibridó en solución de prehibridación (SSC 6x; Denhard's 5x; ficoll 40 0.1%, Polivinilpirrolidona 0.1 %, albumina sérica bovina 0.1%; SDS 0.5%, 1 μ g DNA de espermatozoos de salmón) a 65 °C por 6 h.

La sonda de hibridación correspondió al intrón de la globina β humana, obtenida mediante digestión del plásmido pK14- β con *Nco* I y *Xba* I. La sonda (0.5 Kb) se purificó por electroelución y se cuantificó por espectrofotometría. 50 ng de la sonda se marcaron con dCTP [³²P] utilizando el Random Priming Labelling kit (Stratagene), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, 50 ng de DNA se mezclaron con 1 O.D de hexámeros en un volumen final de 34 μ L, se calentó a 100 °C por 10 min y se enfrió en hielo. Una vez frío, se le agregó 10 μ l de amortiguador de marcaje sin dCTP, 5 μ L de dCTP [³²P] (50 μ Ci, 10 μ Ci/ μ l) y 1 mL de DNA polimersasa Klenow. Se mezcló y se incubó a 37 C por 15 min. La sonda marcada se purificó en columna de Sephadex 50 y se cuantificó en un contador β . Después de las 6 horas de prehibridación, se agregó en la bolsa de hibridación la sonda marcada, y se hibridó a 65 °C toda la noche. Posteriormente la membrana se lavó 2 veces con SSC 2x y una vez con SSC 0.4x, SDS 0.1%. Se expuso por 12 h a -80 °C con pantalla intensificadora en película Biomax (Kodak).

La genotipificación de ratones Tg-CD154 por PCR se realizó de la siguiente manera: En tubos de 0.5 mL se realizaron reacciones de 25 μ L con 1 μ L de DNA genómico, Tris HCl 20 mM,

pH 8.4, KCl 50 mM, 1 U polimerasa Taq (Gibco) cada uno de los dNTP (0.2 mM), MgCl₂ (1.5 mM), y los oligonucleótidos *Riso* y *Xiut* (0.4 μM cada uno). La amplificación se llevó a cabo mediante 35 ciclos compuestos de 3 segmentos a 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg respectivamente. El producto de cada reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Bajo estas condiciones se amplificó un producto único de 790 pb en ratones transgénicos que no se amplifica en ratones no transgénicos.

Los ratones deficientes de CD40¹⁵⁸ fueron proporcionados generosamente por el Dr. Raif Geha (Harvard Medical School, Boston, MA). La genotipificación de ratones CD40^{-/-} se llevó a cabo mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos *Neo-F* 5'-CAT TGA ACA AGA TGGATTGCACGC-3' y *Neo-R* 5'-CTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTG-3' bajo las mismas condiciones que para la genotipificación del transgén. Bajo estas condiciones se amplifica un producto de 450 pb perteneciente al cassette Neo R presente en el o los alelos mutantes de ratones CD40^{+/-} y CD40^{-/-} respectivamente. La distinción entre ratones CD40^{+/-} y ratones CD40^{-/-} se logró mediante citometría de flujo en leucocitos de sangre periférica teñidos con anti-B220-FITC y anti-CD40-PE (*ver adelante*).

Los ratones transgénicos de inmunoglobulina α-LG MD4¹¹⁷ fueron generosamente obsequiados por la Dra Kim Bottomly (Yale University). La genotipificación también se realizó mediante PCR bajo las condiciones descritas para ratones transgénicos, pero a una concentración final de MgCl₂ de 2.5 mM y con una mezcla de los oligonucleótidos IgF1 5'-GCG ACT CCA TCA CCA GCG AT-3' e IgF2 5'-CTG GAG CCC TAG CCA AGG AT-3' a una concentración final de 0.3 μM, y IgR1 5'-ACC ACA GAC CAG CAG GCA GA-3' a una concentración final de 0.6 μM. El programa de termociclado consistió en 12 ciclos compuestos de un segmento a 94 °C por 20 seg, un segmento inicial de alineamiento a 64 °C por 20 seg y un segmento de extensión a 72 °C por 30 seg. En estos primeros 12 ciclos, la temperatura de alineamiento decreció 0.5 °C en cada ciclo. Finalmente, la amplificación finalizó con 20 ciclos adicionales con temperatura de alineamiento fija a 58 °C.

V.5. Preparación de células linfoides, tinción y análisis citofluorométrico: Los ratones analizados fueron sacrificados por narcosis con CO₂. Inmediatamente, se extrajo sangre para

muestra de suero por punción cardíaca con jeringa de insulina. Para la obtención de esplenocitos, se disecó el bazo y se colocó en cajas de Petri de 60 mm de diámetro con 5 ml de amortiguador para FACS (PBS 1X, 5 mM EDTA, 0.05 % NaN_3 , 2% SFB y 1% suero de conejo normal). Se realizó un corte longitudinal en el bazo y se colocó entre 2 portaobjetos con extremo esmerilado. Los esplenocitos se extrajeron mediante presión suave y movimientos cíclicos del portaobjetos, dejandolos escurrir al amortiguador de FACS.

Una vez que quedó la cápsula esplénica vacía, se enjuagaron los portaobjetos con el amortiguador presente en la caja. Los esplenocitos se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y se concentraron por centrifugación a 800g por 2 min. Se resuspendieron en 1 mL de amortiguador de lisis de eritrocitos ACK (NH_4Cl 0.15 M; KH CO_3 1 mM; Na_2EDTA 0.1 mM), se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron nuevamente a 800g por 2 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó en 2 ocasiones con amortiguador para FACS y se resupendió en 1 mL del mismo amortiguador. Los linfocitos de ganglios poplíteos y del timo fueron extraídos bajo el mismo procedimiento, exceptuando el paso de lisis de eritrocitos.

Para las preparaciones de células linfoides de médula ósea se disecaron ambos fémures. Cada fémur se perforó en ambas epifisis con la aguja (27g) de una jeringa de 3 mL cargada con 3 mL de amortiguador de FACS. Una vez perforado se introdujo la aguja hasta el canal medular perfundiéndolo con 0.75 mL de amortiguador colectando las células en un tubo de microcentrifuga por el otro extremo. Luego, la aguja se retiró y se colocó por el otro extremo repitiendo la acción con el amortiguador restante. Las células se lavaron 2 veces con amortiguador para FACS y se resuspendieron en 0.5 mL. Por último, las células de cavidad peritoneal fueron extraídas mediante la infusión de 10 ml de amortiguador de FACS en la cavidad peritoneal. Después de 2 min, se colectó el amortiguador por goteo, a través de una aguja de jeringa de 22g. Las células se concentraron por centrifugación a 800g.

El número absoluto de células nucleadas recuperadas de cada órgano se estimó por conteo en hemocitómetro. Para la cuenta de esplenocitos y timocitos se empleó una dilución 1/100, para

linfocitos de gánglio poplíteo y de médula la dilución fue de 1/10. Las cuentas totales de médula ósea se expresaron como total de células de 2 fémures/2.

Para teñir las células se colocó el volumen necesario para teñir 1.5×10^6 células en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL o en placas de 96 pozos de fondo en "U". Las células sedimentadas por centrifugación (800g, 2 min) se resuspendieron en 100 μ L de amortiguador de FACS y una dilución 1:200 de anticuerpo α receptor Fc γ III/II (α CD16/CD32, clona 2.4G2, 0.5 mg purificado, Pharmingen, CA) y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se lavaron una vez con 200 μ L de amortiguador de FACS y luego se incubaron en 100 μ L de amortiguador de FACS con las combinaciones y diluciones de anticuerpos conjugados a fluorocromos descritos detalladamente en la **tabla I** (Apéndice, p 138).

Después de incubar 30 min con los anticuerpos conjugados, las muestras se lavaron en dos ocasiones con 200 μ L de amortiguador para FACS. En los casos en los cuales se utilizaron combinaciones de anticuerpos en los que uno de los conjugados fuera con biotina, se incubaron adicionalmente por 30 min con el conjugado estreptavidina-fluorocromo y nuevamente lavadas 2 veces. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μ L y se transfirieron a tubos para FACS (Falcon, BD) en un volumen final de 400 μ L.

Para el análisis de tres colores, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSort de láser de argón de 488 nm (Becton Dickinson Immunocytometry systems, CA), utilizando el Software Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry systems). Para el análisis de 4 colores se utilizó un citómetro FACSCalibur equipado con láser dual de argón de 488 nm/diodo rojo (Becton Dickinson Immunocytometry systems), utilizando el Software Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry systems). Como control negativo o de autofluorescencia se incluyó una muestra de cada tejido sin teñir con la finalidad de ajustar los voltajes de los fotomultiplicadores de cada detector de fluorescencia. Para la compensación de fluorescencia se utilizaron células de cada órgano teñidas individualmente con un anticuerpo conjugado al fluorocromo correspondiente a cada detector de fluorescencia (FITC-FL1; PE-FL2, Cy5-PE-FL3 y APC-FL4). Una vez adquirida la muestra, la mayor parte del análisis se

llevo a cabo utilizando el Software Win MDI version 2.8 (Copyright Joseph Trotter, Scripps Research Institute. San Diego, CA).

V.6. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo: Para analizar la fase del ciclo celular en linfocitos ProB de médula ósea de ratón, se obtuvo un "pool" de células de médula ósea obtenidas de ambos fémures y tibias de 4 ratones transgénicos y 4 controles de camada, tal como se describió en la sección anterior, con excepción de que se lisaron eritrocitos con amortiguador ACK. La suspensión de células fue ajustada a 15×10^6 /mL de amortiguador de FACS y se incubaron 30 min en hielo con una mezcla de anticuerpos anti-B220/Cy5-PE, anti-CD43/PE, anti-CD24-biotina y anti-BP1/FITC a las diluciones indicadas en la **tabla 1**. Después de 2 lavados, las células se ajustaron a 5×10^6 en amortiguador de FACS sin suero fetal bovino. Las fracciones A, B, y C de Hardy ³¹ (B220⁺/CD43⁺/CD24⁻/BP1⁻; B220⁺/CD43⁺/CD24⁺/BP1⁻; B220⁺/CD43⁺/CD24⁺/BP1⁺; respectivamente), fueron definidas mediante regiones cuadrangulares y purificadas en un citómetro de flujo FACStar (Becton Dickinson).

Una vez confirmada su pureza, se fijaron con etanol al 70 % toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 0.5 mL de PBS con yoduro de propidio (20 µg/mL) y RNAsa A 1 µg/ml. Se incubaron 1 h a temperatura ambiente y se analizaron en un citómetro FACSsort (Becton Dickinson) en el modo de discriminación de dobletes en el canal FL-2.

Para el estudio de ciclo celular de linfocitos B en poblaciones linfoides de bazo y ganglio no purificadas se obtuvieron linfocitos tal como se describió en la sección anterior, y se tiñeron con anti-B220-FITC. Después de un lavado se incubaron 30 min adicionales con anti-Ig de rata conjugada con FITC (Jackson Immunoresearch) y se lavó 2 veces con amortiguador para FACS. Posteriormente las muestras fueron procesadas de la misma forma que los linfocitos ProB purificados y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando FL1 y el modo de discriminación de dobletes en FL2.

V.7. Determinación de anticuerpos anti-fosfatidilcolina (FC): Los ratones TgCD154, MD4, TgCD154 x MD4 y no transgénicos de 6 semanas de edad fueron tratados con 50 μ g de LPS (Sigma) en PBS o solo PBS por vía intraperitoneal en 3 ocasiones a intervalos de una semana. Una semana después del último tratamiento fueron sacrificados y se les extrajo sangre por punción cardiaca. El suero se congeló a -20°C hasta ser utilizado.

Para la determinación de anticuerpos anti-fosfatidil colina se utilizó el método descrito por Cunningham²⁷⁸. Se obtuvo sangre de ratón Balb/c normal anticoagulada con EDTA 50mM. Se diluyó 1:3 en PBS y se sometió a separación por centrifugación en Ficoll-Hypaque. Se colectaron los eritrocitos, se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS, se ajustaron al 50 % y se incubaron con bromelaina (Sigma) 100 mg/mL en PBS a 37°C por 30 min. Posteriormente se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS. 0.5×10^6 eritrocitos tratados con bromelaina fueron incubados en 100 μ L de PBS en placas de 96 pozos con fondo U con suero problema diluido 1:50 a 4°C durante 30 min. Posteriormente, fueron lavados 2 veces con 200 μ L de PBS y luego incubados con 0.1 μ g de anti-IgM o anti-IgA murina de conejo biotinilada (Zymed, San Francisco, CA) a 4°C por 30 min. Posteriormente, los eritrocitos fueron lavados 2 veces e incubados con estreptavidina-PE (Pharmingen) a 4°C por 30 min. Finalmente, se lavaron en 2 ocasiones con PBS y se resuspendieron en 0.4 mL. Las muestras se transfirieron a tubos de FACS y fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) en el canal de fluorescencia FL2. Como control negativo se utilizó una muestra con eritrocitos bromelinizados tratados con anticuerpo secundario y estreptavidina-PE. Se utilizó la intensidad media de fluorescencia para estimar los valores relativos de anticuerpos anti-fosfatidilcolina.

V.8. Determinación de inmunoglobulina anti-eritrocito de carnero: Se inmunizaron ratones transgénicos y controles de camada de 6 a 8 semanas de edad con 100 μ L de eritrocitos de carnero al 10 % en solución Alsevers o con solución de Alsevers como control. Después de 7 días se reinmunizaron con las misma dosis. A los 12 días se colectó suero y se utilizó para determinar anticuerpos hemolíticos.

Para la determinación de anticuerpos hemolíticos se colocaron 5×10^6 de eritrocitos de carnero en amortiguador GVB (pH 7.35, NaCl 0.83 %, 5,5' dietil-barbiturato 0.1 %, gelatina 0.1 %, 58

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CaCl₂ 0.3 mM, y MgCl₂ 2 mM) en placas de 96 pozos de fondo U. El suero problema se descomplementó a 56 °C por 30 min, y se añadió a una dilución final de 1:100. Como fuente de complemento se uso suero humano preadsorbido con eritrocitos de carnero a una dilución final de 1:50. La mezcla se incubó a 37 °C por 60 min. Posteriormente, la placa se centrifugó a 1000g por 2 min y los sobrenadantes se colectaron para medir la absorbancia a 451 nm. Como control negativo se utilizaron muestras de eritrocitos incubadas con sueros no inmunes de raton normal, así como sueros de ratón normal sin complemento humano y muestras tratadas con complemento humano sin suero inmune.

V.9. Evaluación de la expresión del transgén por RT-PCR: Ratones de 4 semanas de edad fueron sacrificados por narcosis por CO₂. Con el fin de obtener RNA de los órganos pero no de la sangre que los irriga, se realizó una incisión en la línea media del tórax para exponer el corazón, al cual se le realizó una incisión en la aurícula derecha. Después se inyectaron 20 ml de PBS con EDTA 10 mM frío en el ventrículo izquierdo. Se obtuvieron muestras de diversos órganos (ver resultados), mismas que fueron congeladas en N₂ líquido hasta su uso.

De cada muestra se extrajo RNA total homogenizando 1g de tejido con un pistilo mecánico en 1 mL de TriPure (Boeringer Mannheim). Una vez homogenizado, se añadieron 200µL de cloroformo y se agitó en vórtex 5 min, seguido de centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó la fase acuosa y se precipitó con 500 µL de isopropanol. El precipitado fue lavado con 1 mL de etanol al 70% en dH₂O tratada con dietilprocarbonato (DEPC) y resuspendido en 50 µL de dH₂O-DEPC. Con el fin de minimizar contaminación genómica, a cada muestra de RNA se le añadió 1 mL adicional de TriPure y se repitió el proceso de extracción. El RNA precipitado se secó 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 mL de dH₂O-DEPC y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para generar cDNA se mezcló 1 µg de RNA total de cada tejido con 100 ng de oligo d-T₁₅₋₁₈ (Gibco BRL, UK) en 10 µl de dH₂O-DEPC. Se incubó 10 min a 70 °C y luego se enfrió en hielo por 5 min. La reacción de síntesis de cDNA se realizó llevando la mezcla de RNA oligo d-T a un volumen final de 25 µL en dH₂O-DEPC Tris-HCl 50mM, pH 8.3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; ditiotreitól 10 mM, inhibidor de RNasa (Gibco) y 200 U de transcriptasa

reversa Superscript II RNase H⁻ (Gibco). Las reacciones se incubaron 1 h a 42 °C y luego fueron inactivadas a 70 °C por 10 min.

Para la amplificación del cDNA de CD154 se prepararon reacciones de 25 µL con Tris HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, 1 U polimerasa Taq (Gibco) cada uno de los dNTP (0.2 µM), MgCl₂ (1.5 mM), oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido (0.4 µM) y 1/25 de la reacción de cDNA. Dos pares de oligonucleótidos fueron utilizados: *KenPr* 5'-GCT AGC CCT CTT CCT TCC TCG AC-3' (sentido) y *Xiut* 5'-GGG CCC TCT AGA ACA GCG CAC TGT TCA-3', estos amplifican exclusivamente el cDNA de CD154 derivado de la transcripción del transgén pero no del gen de CD154, puesto que el oligo *KenPr* está basado en el promotor Vκ, abajo del sitio de inicio de transcripción. La amplificación se llevó a cabo mediante 35 ciclos compuestos de 3 segmentos a 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg respectivamente. Esta combinación de oligos permite amplificar cDNA como un producto de 800 pb que puede ser distinguido electroforéticamente de un producto de 1.6 kb derivado de la amplificación de DNA genómico contaminante. Sin embargo los oligos *KenPr* y *Xiut* no permiten amplificar cDNA de CD154 en ratones no transgénicos.

Con el fin de contar con un sistema que permita comparar la expresión de CD154 en ratones transgénicos y no transgénicos se utilizó una segunda combinación de oligonucleótidos: *gp39F* 5'- GGA TCC TCA AAT TGC AGC ACA CG-3', ubicado en el exón 4 del gen de CD154, en la posición 363-385 del RNAm. Como oligo antisentido se utilizó *IsoSer* 5'- CTC TCA GAT CCA ATG CTG GGC TTC AGC C -3', ubicado en el exon 5, en la posición 589-617 del RNAm. Ambos oligonucleotidos amplifican un producto de 255 pb derivados de cDNA y de 3.6 kb en caso de contaminación genómica²⁷⁹. La composición de la reacción fue idéntica que para el par *KenPr/Xiut*. Con el fin de obtener una idea más realista de los niveles de expresión del transgén en los diferentes tejidos las condiciones de termociclado fueron de 15 ciclos compuestos de 3 segmentos a 95 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg, respectivamente. Como control interno de RT-PCR se amplificó un producto de 450 pb derivado del cDNA de actina β con los oligos βA1 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C- 3' y βA2 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3' bajo las mismas condiciones que las descritas para *KenPr/Xiut* y *gp39F/IsoSer* a excepción de que el programa

de termociclado fue de 15 ciclos compuestos 3 segmentos a 95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, respectivamente.

Después de 15 ciclos de amplificación, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y transferidas a membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham, UK) e hibridadas con el cDNA de CD154 o actina β marcados con fosfatasa alcalina utilizando el sistema AlkPhos (Amersham) para marcaje, hibridación y detección por quimioluminiscencia. La hibridación se realizó en amortiguador de hibridación proporcionado por el fabricante con NaCl 0.5 M a 65 °C toda la noche. Se realizaron 2 lavados en amortiguador primario (urea 2M, NaCl 150mM, SDS 0.1%, NaH_2PO_4 50mM, MgCl_2 1mM y reactivo de bloqueo del fabricante 1%) a 65 °C por 10 min cada uno. Se realizaron dos lavados adicionales amortiguador de lavado secundario (Tris Base 50mM, NaCl 100mM, MgCl_2 2 mM) por 5 min cada uno. La membrana se expuso por 10 min a placas Hyperfilm ECL (Amersham).

V.10. Determinación de inmunoglobulina sérica: Se determinó IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ e IgA en suero de ratones entre 2 semanas y 10-12 semanas de edad por el método de ELISA. Placas de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) fueron cubiertas con antisuero polivalente de cabra anti-Ig murina (Zymed) mediante incubación en amortiguador de carbonatos pH 9.6 a 4 °C toda la noche. Posteriormente cada placa se lavó 2 veces con PBS Tween-20 0.05% (PBS-T20) y se añadieron diluciones tres veces seriadas, de 1:30 a 1: 90,000 de cada uno de los sueros problema en PBS-T20, se incubaron a 37 °C por 2 h y se lavaron tres veces con PBS-T20.

Posteriormente se añadió a cada pozo x μg de anticuerpo de conejo anti-isotipo murino biotinilado (Zymed), se incubó a 37 °C por 2 h. Después de 3 lavados con PBS-T20, se incubó con x μg de conjugado estreptavidina-Peroxidasa de rábano (Zimed) a 37 °C por 30 min. Después de tres lavados con PBS-T20, se añadió x mg/ml de ortofenil-diamina (Zymed) en amortiguador de citratos, pH 5.3 y H_2O_2 al 0.3 % por 5 min. La reacción se inactivó con H_2SO_4 1 N. La absorbancia se cuantificó en un lector de ELISA (LabSystems, Helsinki, Finlandia) a 492 nm. Los niveles séricos de Ig se expresaron como la dilución requerida para obtener una absorbancia de 0.05.

VI. Resultados.

VI.1. Generación y caracterización de ratones transgénicos.

VI.1.1. Generación de ratones transgénicos: Se microinyectaron 320 cigotos (C3H x C57BL/6) de acuerdo a lo descrito en capítulo materiales y métodos. 280 cigotos sobrevivieron la inyección (87.5% viabilidad) y fueron implantados en grupos de 40 en oviductos de 7 hembras C3H pseudopreñadas. Al cabo de 20 días nacieron un total de 34 crías potencialmente transgénicas, 15 machos y 19 hembras, mismas que fueron genotipificadas mediante hibridación de Southern y PCR a partir de ADN genómico. Como lo muestran las **figuras 3 A-B**, 10 de 34 ratones (29%) fueron positivos por ambos métodos. Los ratones fundadores se identificaron con los números 4, 12, 16, 22, 23, 28, 29, 31, 32, y 34, respectivamente.

Los hembras fundadoras 12, y 34 murieron entre la segunda y tercera semanas de vida por causas desconocidas. Las hembras fundadoras 29 y 32 murieron a la octava semana de vida sin haber dejado progenie. En estos casos se detectó una reducción en el desarrollo corporal y el pelaje espinado. En el caso de la número 32 fue posible rescatar el cadáver y a pesar del estado de descomposición fue posible identificar esplenomegalia y por microscopia de luz, alteración de la microarquitectura esplénica e infiltrados linfoides periportales.

VI.1.2. Establecimiento de líneas transgénicas: Los fundadores machos 4, 16, 22, 23 y la hembra 28 parecían sanos y fueron retrocruzados con parejas C57BL/6. Mientras que en el caso de las líneas 4 y 22 solo se estudio la F1, las líneas 16 y 23 fueron seguidas hasta la F3 y la línea 28 se ha mantenido como el modelo de estudio durante cuatro años y al menos seis generaciones, lo cual revela que en ninguna de las líneas la presencia del transgen afecta directamente la fertilidad. Es claro que en las cinco líneas, la segregación del transgén ocurre en ambos sexos lo cual demuestra que este se integró en un autosoma. Así mismo, la presencia del transgén en aproximadamente 50% de la camada sugiere que el evento de inserción ocurrió en un solo complemento ancestral.



Figura 3. Identificación de ratones transgénicos fundadores. **A)** Amplificación por PCR de un producto de 0.8 kb correspondiente al ADNc de CD154 a partir de ADN genómico de cola. **B)** Confirmación mediante hibridación tipo Southern a partir de 10 µg de ADN genómico digerido con *Nco I* y *Xba I*. Como sonda se utilizó un fragmento de 0.8 kb correspondiente al intrón de la globina β humana, obtenido mediante digestión del plásmido pEi/prVκβ con *Nco I* y *Xba I* y marcado con P³².

Debido a que la mortalidad en los fundadores predominó en hembras se sospechó que el fenotipo en hembras transgénicas se asociara a un fenotipo patológico grave. Sin embargo, hasta el momento no hemos identificado en la progenie de los fundadores sobrevivientes diferencias en la morbi-mortalidad entre hembras y machos transgénicos.

VI.1.3. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas.- Con el fin de iniciar la caracterización de la expresión del transgén en las diferentes líneas, se tomaron muestras de sangre periférica de los machos 4, 16 y 22 con el fin de analizar la expresión de CD154 en leucocitos de sangre periférica por citometría de flujo mediante una doble tinción con los anticuerpos monoclonales anti-B220-FITC y anti-CD154 (MR1) biotinilado y revelado con estreptavidina- PE.

La **figura 4A** muestra el sorprendente hallazgo de que la proporción de linfocitos B (células B220⁺) en sangre periférica de los fundadores 4, 16 y 22 fue de 1.6, 1 y 1.1% en comparación con 35.8 % el ratón C3H x C57BL/6 no transgénico. La deficiencia es tal que la evaluación de la expresión de CD154 no se pudo llevar a cabo con certeza debido al bajo número de eventos B220⁺. No fue posible detectar la expresión de CD154 en linfocitos totales, lo cual sugiere que en estos fundadores no se presenta expresión de CD154 en linfocitos no B de sangre periférica (**Figura 4B**).

Con el fin de confirmar si la ausencia de linfocitos B periféricos era un rasgo heredable imputable al transgén y no a efectos de la posición de la inserción del transgén, se realizaron diversos experimentos en los cuales se determinó la proporción y fenotipo de linfocitos B en órganos linfoides primarios y secundarios de la progenie F1 de las líneas 4, 16, 22, 23 y 28 mediante citometría de flujo. Así mismo, aprovechando la versatilidad de esta técnica y la disponibilidad de una gran variedad de anticuerpos monoclonales en contra de diversos marcadores de linfocitos murinos, se procedió a caracterizar la expresión de CD154, así como el fenotipo de las distintas subpoblaciones de linfocitos, con especial énfasis en el compartimiento de linfocitos B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

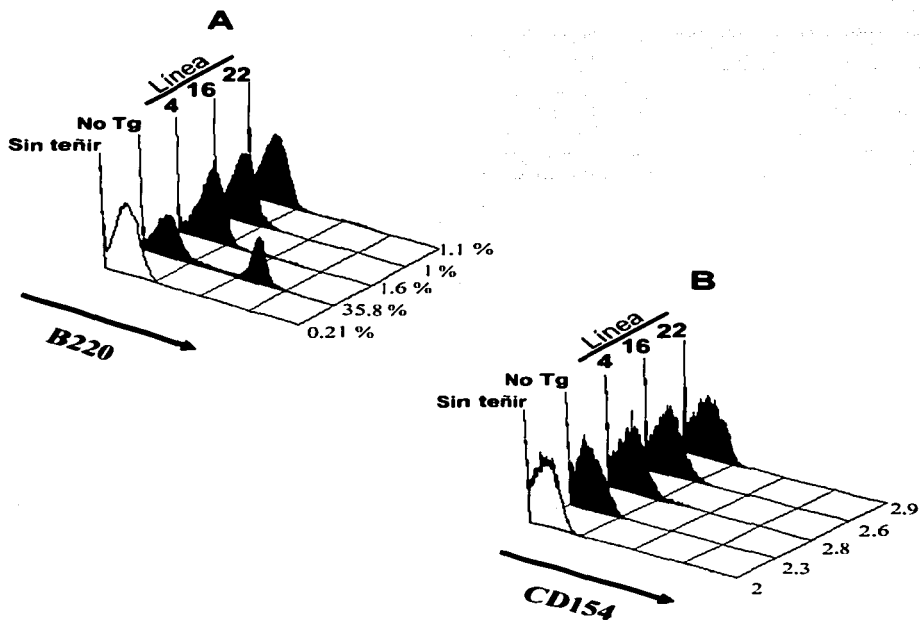


Figura 4. Linfocitos B en sangre Periférica. Análisis citofluorométrico linfocitos B de sangre periférica en machos fundadores. **A)** Proporción de linfocitos B B220*. **B)** Expresión de CD154 en linfocitos totales. Los valores de la derecha representan la intensidad media de fluorescencia en FL-2. 1×10^6 leucocitos se tiñeron con los anticuerpos monoclonales anti-B220-FITC y anti-CD154-biotina, revelado con estreptavidina-PE. Los histogramas derivan de la adquisición de al menos 5000 linfocitos definidos con base a los valores de FSC y SSC.

VI.1.4.Linfocitos B en órganos linfoides secundarios: El porcentaje de linfocitos B en el bazo de un ratón normal oscila entre el 45 y 65 % del total de células nucleadas mientras que en los ganglios linfáticos oscila entre el 25 y 30%. Con el fin de obtener una mejor interpretación de los resultados obtenidos en sangre periférica de los fundadores, se analizó por medio de citofluorometría el compartimiento de linfocitos B en el bazo y en ganglios linfáticos popliteos de ratones F1 de 6 a 8 semanas de edad derivados de la cruce entre fundadores de cada línea con ratones normales C57BL/6.

De acuerdo con lo observado en sangre periférica, el porcentaje de linfocitos B B220⁺/IgM⁺ esplénicos en ratones transgénicos fue de 7.2 % para la línea 4 ($n=1$), 9.1% para la línea 16 ($n=1$), 11.8 % para la línea 22 ($n=1$), 1.5 % para la línea 23 ($n=1$), y 4.3% para la línea 28 ($n=1$). En promedio, el porcentaje de linfocitos B220⁺/IgM⁺ en los ratones transgénicos independientemente de la línea estudiada fue de 6.7 % ($\pm 4\%$, $n=4$) en comparación con el promedio de linfocitos B220⁺/IgM⁺ de los controles de camada no transgénicos, que fue de 52.6 % ($\pm 7.3\%$, $n=4$). Estas cifras permiten calcular que en los ratones transgénicos se presenta una reducción promedio de 7.8 veces la proporción de linfocitos B esplénicos con respecto a lo observado en ratones control (**Figura 5 A-B**).

También se estimó la proporción de linfocitos B en los ganglios linfáticos popliteos de ratones F1 derivados de las líneas 22, 23 y 28. En estos ratones, el porcentaje de linfocitos B B220⁺/IgM⁺ en ganglio fue de 2.8 %, 4% y 1.3%, respectivamente. El promedio del porcentaje de linfocitos B en los transgénicos, independientemente de la línea fue de 2.7 % ($\pm 1.3\%$, $n=3$) en contraste con un promedio de 27.4 % ($\pm 1.1\%$, $n=2$) en los controles no transgénicos de camada. Esto representa una reducción de 10 veces la proporción de linfocitos B en ganglios linfáticos de ratones transgénicos con respecto a lo observado en los controles de camada no transgénicos (**Figura 6**).

VI.1.5.Maduración de linfocitos B en la médula ósea: Debido a la reducción tan marcada de linfocitos B encontrada en sangre periférica y órganos linfoides secundarios, fue necesario determinar en las diferentes líneas transgénicas, si tal reducción se debía a una falta de producción en el órgano linfóide primario o bien, si la reducción se debía a una muerte

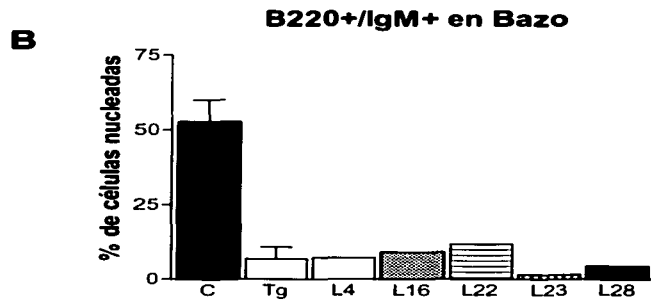
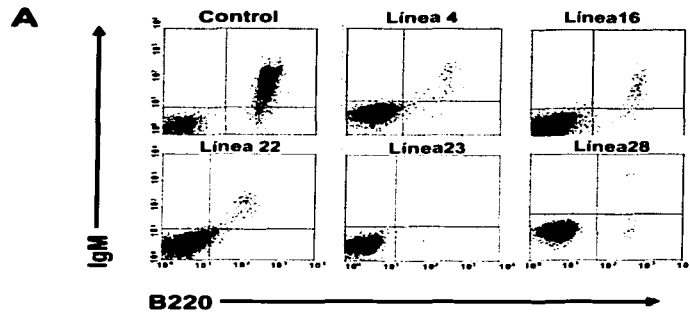


Figura 5. Linfocitos B en el bazo. **A)** Análisis citofluorométrico de linfocitos B esplénicos de la generación F1 entre fundadores 4,16,22,23 y 28. Se muestra un solo control no transgénico representativo de los demás experimentos. **B)** Promedio \pm desviación estándar (D.E.) del porcentaje de linfocitos B220⁺/IgM⁺ de controles no transgénicos (*barra roja*, $n=4$), de las cuatro líneas como un solo grupo (*barra blanca*, $n=5$); y de los ratones F1 de las líneas 4 ($n=1$), L16 ($n=1$), L22 ($n=1$), L23 ($n=1$) y L28 ($n=1$) (*barras azules*).

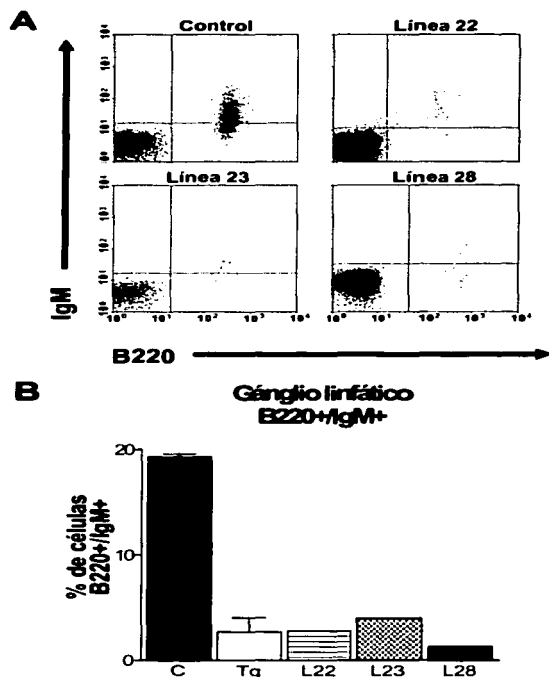


Figura 6. Linfocitos B en el gánglio linfático. **A)** Análisis citofluorométrico de linfocitos B de gánglio linfático poplíteo de la generación F1 de fundadores 22, 23 y 28. Se muestra un solo control no transgénico representativo de los demás experimentos. **B)** Promedio \pm D.E. del porcentaje de linfocitos B220⁺/IgM⁺ de controles no transgénicos (*barra roja*, $n=2$), de las tres líneas como un solo grupo (*barra blanca*, $n=3$); y de los ratones F1 de las líneas L22 ($n=1$), L23 ($n=1$) y L28 ($n=1$) (*barras azules*).

acelerada en el órgano linfóide secundario. Entonces, se analizaron los diferentes estadios de maduración por los cuales atraviesa un linfocito desde su compromiso al linaje B hasta su maduración y egreso de la médula ósea hacia el órgano linfóide secundario.

Utilizando el sistema de clasificación de Hardy, et al.³¹, por ser práctico y tener acceso a los anticuerpos necesarios, pudimos analizar con profundidad la maduración de linfocitos B en ratones transgénicos F1 de las diferentes líneas transgénicas. Como se puede apreciar en la **figura 7**, la proporción de linfocitos B totales (con base a la expresión de B220) se encontró marcadamente reducida. Independientemente de la línea, el promedio del porcentaje de células B220⁺ fue de 8.2 % ($\pm 3.1\%$, $n=10$) en comparación con 30.9% ($\pm 6.3\%$, $n=9$) en ratones control, esto es, una reducción promedio de 3.7 veces la proporción de linfocitos B en transgénicos con respecto a los controles (**Figura 7**).

El análisis comparativo por etapas es aún más revelador. La proporción de linfocitos ProB (B220⁺/CD43⁺) no es muy diferente en ratones transgénicos de lo encontrado en los ratones control, ya que el promedio del porcentaje de linfocitos B220⁺/CD43⁺ en ratones transgénicos fue de 4.5% ($\pm 0.9\%$, $n=10$) y de 6.4 % ($\pm 1.8\%$, $n=9$) en controles de camada. Sin embargo, se encontró una dramática reducción del porcentaje de la población PreB B220^{bajo}/CD43⁺ en todas las líneas. Tomados como un solo grupo, el promedio del porcentaje de linfocitos PreB en ratones transgénicos fue de 1.3% ($\pm 0.6\%$, $n=10$) y de 16% ($\pm 5.7\%$, $n=9$) en ratones control, lo cual implica una reducción de 12 veces la proporción de linfocitos PreB. Por último, como es de esperarse, la población de linfocitos B recirculantes también se encontró afectada en transgénicos, aunque fue esta población la que presentó más variabilidad entre experimentos. El promedio del porcentaje de linfocitos B B220^{alto}/CD43⁺ en el grupo de ratones transgénicos fue de 2 % ($\pm 2\%$, $n=10$) en comparación con 7.8 % ($\pm 5\%$, $n=9$) en controles (**Figura 5**). Es importante señalar que no se encontró correlación entre la reducción de las proporciones de linfocitos PreB en las diferentes líneas con la proporción de linfocitos B recirculantes, de bazo o de ganglio correspondientes.

El análisis de subpoblaciones de linfocitos B en la médula ósea mediante la detección de B220 y CD43 permite definir a grandes rasgos la maduración de los mismos. En este caso particular

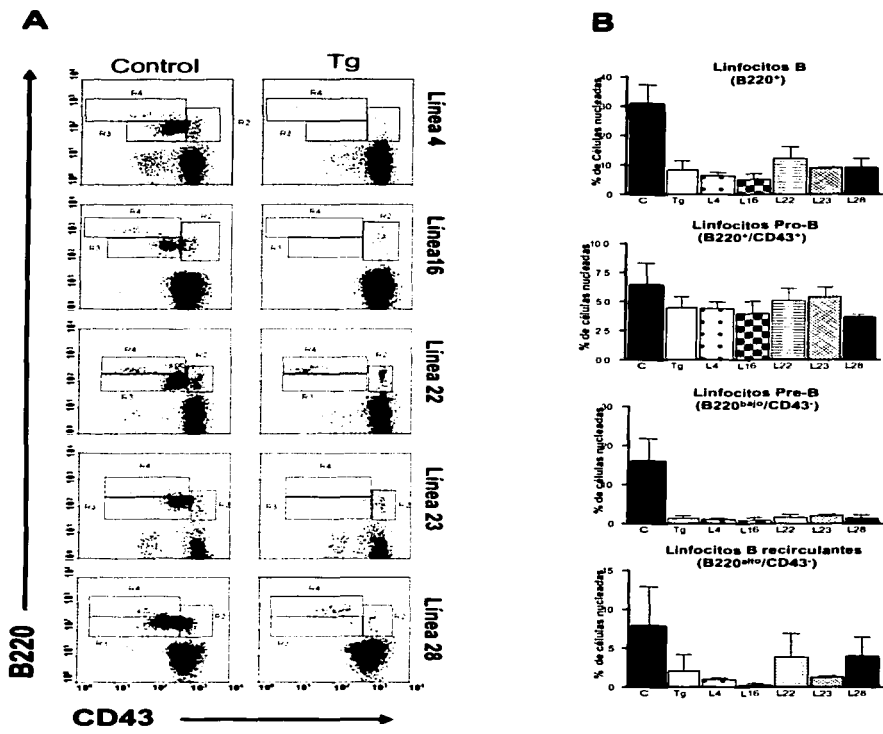


Figura 7. Linfocitos B en la médula ósea. **A)** Análisis citofluorométrico de la maduración de linfocitos B en médula ósea de ratones F1 derivados de retrocruza de los fundadores 4, 16, 22, 23 y 28 con ratones C57BL/6. En el panel derecho (*columna der.* ratón transgénico de cada línea. *Columna izq.* control de camada no transgénico). Se muestran las subpoblaciones ProB (B220⁺/CD43⁺), PreB (B220^{hi/lo}/CD43⁻); y linfocitos B recirculantes (B220^{allo}/CD43⁻), enmarcadas en las regiones R2, R3 y R4, respectivamente. **B)** Promedio \pm D.E. de las proporciones de cada etapa de maduración de linfocitos B de médula ósea de por lo menos 2 ratones transgénicos de cada línea (*barras azules*) y 9 individuos no transgénicos (*barras rojas*).

nos permitió identificar que los ratones transgénicos presentan un defecto en la transición de ProB a PreB.

Con el fin de definir con puntualidad la etapa afectada en las diferentes líneas transgénicas, se analizó la expresión de CD24, Bp1, B220 y CD43 en la médula ósea de ratones F1 derivados de las líneas 16, 22, 23 y 28 por citofluorometría de cuatro colores. La **figura 8** muestra que, exceptuando a la línea 22, la proporción de células de fracciones A y B de las líneas 16, 23 y 28 son muy similares a lo encontrado en ratones control. Sin embargo, en ratones transgénicos la proporción de células en la fracción C corresponde a la mitad de lo encontrado en controles. En el caso de la línea 22 se presenta una marcada reducción en las fracciones B y C, con un correspondiente aumento relativo en la fracción A. Entonces, la marcada reducción en la población PreB encontrada en todas las líneas transgénicas tiene su origen en la transición de la fracción B a la C para las líneas 16, 23 y 28, mientras que en la línea 22 el defecto ocurre durante la transición de la fracción A a la fracción B.

VI.1.6. Linfocitos T: CD154 es una molécula que normalmente expresan los linfocitos T activados. Cuando CD154 interactúa con CD40 en la membrana de células presentadoras de antígeno induce, entre otros efectos, la expresión de moléculas coestimuladoras que coadyuvan a la activación e inducción de la proliferación en el linfocito T¹⁴³. Más aún, se ha descrito linfoproliferación de derivados del linaje de linfocitos T en diferentes modelos experimentales caracterizados por expresión aberrante de CD154²²⁴⁻²²⁵.

Por estos antecedentes, fue importante determinar si la expresión de CD154 en linfocitos B en las diferentes líneas de ratones transgénicos afecta o no al compartimento de linfocitos T. Para tal fin, se analizaron por citofluorometría las proporciones de linfocitos T totales, linfocitos T CD4 (cooperadores), y linfocitos T CD8 (citotóxicos) en bazo y ganglio linfático poplíteo de ratones F1 derivados de cruces entre los fundadores y ratones C57BL/7 (**Figura 9**).

La proporción de linfocitos T Thy 1.2⁺ en bazo de ratones transgénicos fue de 52.6 % ($n=1$), 21.4 % ($n=1$), 46.3 % ($n=1$), 57.8 % ($n=1$) y 32.2 % ($n=1$) para las líneas 4, 16, 22, 23 y 28, respectivamente. Independientemente de la línea, el promedio de la proporción de linfocitos T

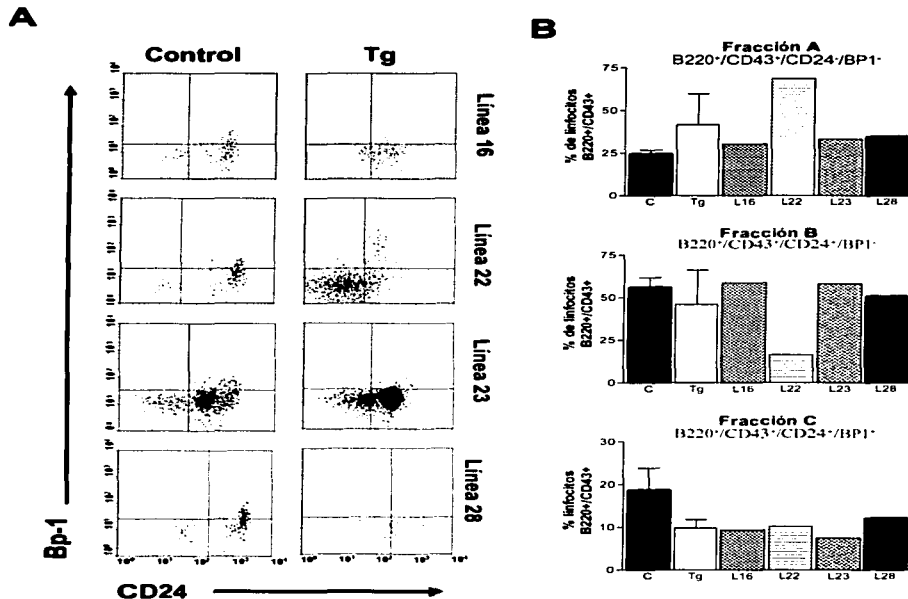


Figura 8. Linfocitos proB de la médula ósea. **A)** Análisis citofluorométrico de 4 colores de la maduración de linfocitos ProB (B220⁺/CD43⁺), de acuerdo a la expresión de CD24 y BP-1, en médula ósea de ratones F1 derivados de retrocruza de los fundadores 16, 22, 23 y 28 con ratones C57BL/6. **B)** Promedio \pm D.E. de los porcentajes de linfocitos ProB (B220⁺/CD43⁺) de cada una de las fracciones definidas por la expresión de CD24 y BP-1. La fracción A corresponde a linfocitos ProB B220⁺/CD43⁺/CD24⁻/BP1⁻; la fracción B corresponde a linfocitos ProB B220⁺/CD43⁺/CD24⁺/BP1⁻; y la fracción C corresponde a linfocitos ProB B220⁺/CD43⁺/CD24⁺/BP1⁺. Ratones control de camada no transgénicos (*barras rojas*, $n=4$); ratones transgénicos como un solo grupo (*barras blancas*, $n=4$); ratón transgénico de cada línea (*barras azules*, líneas 16, $n=1$; 22, $n=1$; 23, $n=1$ y 28, $n=1$, respectivamente).

Thy 1.2⁺ en ratones transgénicos fue de 42 % (± 15 %, $n=5$), en contraste con 28.8 % (± 9.9 %, $n=4$) en ratones control no transgénicos (**Figura 9A**). El incremento proporcional de linfocitos T observado en ratones transgénicos no implica un aumento en el número absoluto de linfocitos T. En un experimento independiente con ratones de ocho semanas de edad derivados de la línea 28, observamos que el promedio del número absoluto de linfocitos T CD5+/B220- fue de 53.2×10^6 (± 5.6 , $n=2$) en ratones transgénicos y de 50×10^6 (± 12 , $n=2$) en sus controles de camada.

Consistentemente, la proporción de linfocitos T CD4⁺ en bazo fue de 32.2 % ($n=1$), 13.1 % ($n=1$), 17.9 % ($n=1$), 40.4 % ($n=1$) y 16.4 % ($n=1$) para las líneas 4, 16, 22, 23 y 28, respectivamente. Independientemente de la línea, el promedio de la proporción de linfocitos T CD4⁺ en ratones transgénicos fue de 24% (± 11 %, $n=5$), en contraste con 19.6 % (± 7.1 %, $n=5$) en ratones control (**Figura 9B**).

La proporción de linfocitos T CD8⁺ en bazo fue de 23.9 % ($n=1$), 8.8 % ($n=1$), 17.4 % ($n=1$), 23 % ($n=1$) y 17 % ($n=1$) para las líneas 4, 16, 22, 23 y 28, respectivamente. Independientemente de la línea, el promedio de la proporción de linfocitos T CD8⁺ en ratones transgénicos fue de 24% (± 11 %, $n=5$), en contraste con 18 % (± 6 %, $n=5$) (**Figura 9C**).

En resumen, se encontró un ligero aumento en la proporción de linfocitos T y consecuentemente en las dos subpoblaciones principales, CD4 y CD8. Debido a la gran variabilidad y a lo pequeño del tamaño de muestra, no se hallaron diferencias asociadas a la presencia del transgen en las diferentes líneas. El aumento marginal de las proporciones de linfocitos T observado en los ratones transgénicos no parece implicar un aumento real del número de linfocitos T, sino que más bien refleja la reducción proporcional de linfocitos B. Sin embargo, es posible identificar que la proporción de linfocitos T CD8 con respecto a la de CD4 está alterada. En ratones normales, el coeficiente % CD4/% CD8 fue de 1.9 (± 0.3 , $n=5$). En ratones transgénicos este coeficiente fue de 1.3, 1.4, 1.7 y 0.9 para las líneas 4, 16, 22, 23 y 28, respectivamente, sumando un promedio de 1.3 (± 0.3 , $n=5$) (**Figura 9D**). Esto implica que en ratones transgénicos la relación numérica entre CD4 y CD8 es cercana a 1.

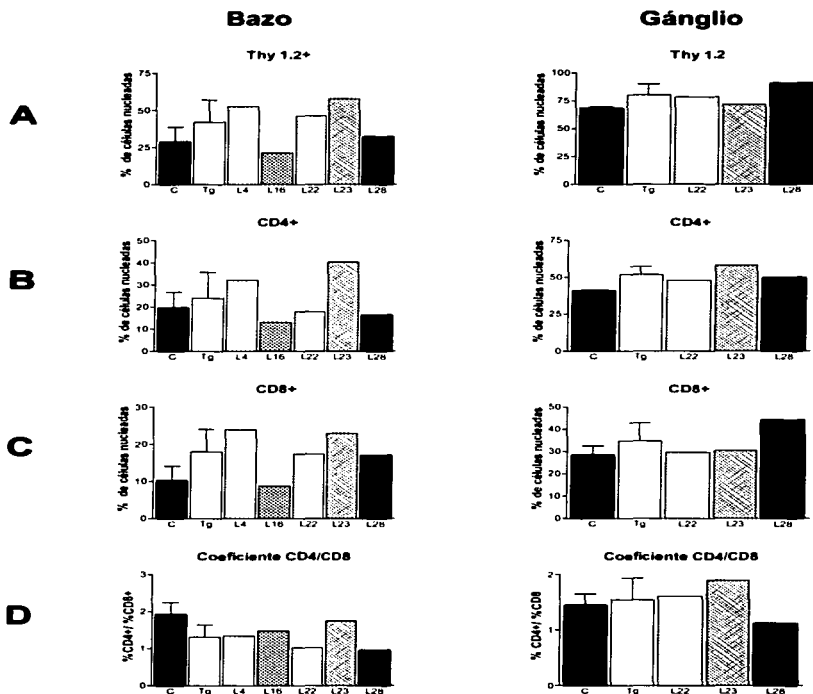


Figura 9. Análisis del compartimento de Linfocitos T. Porcentaje de linfocitos T esplénicos (*columna izquierda*) y de gánglio linfático políteo (*columna derecha*) de ratones F1 de cruza de fundadores 4, 16, 22, 23 y 28 para bazo, y 22, 23 y 28 para gánglio. Ratones control no transgénicos (*barras rojas, n= 5*), promedio de los ratones transgénicos como un solo grupo (*barra blanca, n=5*), y transgénicos de cada línea (*barras azules, n=1* de cada línea). **A)** % de linfocitos T totales determinado en base a la expresión del marcador Thy 1.2. **B)** % de Linfocitos T cooperadores determinado en base a la expresión del marcador CD4. **C)** % de linfocitos T citotóxicos determinado en base a la expresión del marcador CD8. **D)** Coeficiente del % de linfocitos T CD4⁺ entre linfocitos T CD8⁺.

En ganglios linfáticos solo fue posible estudiar ratones F1 derivados de las líneas 22, 23 y 28 (Figura 9). Los resultados fueron muy similares a los del bazo. El promedio de linfocitos T Thy 1.2⁺ en ratones transgénicos fue de 80.2 % (± 8.0 , $n=3$), en contraste con 68.3 % (± 1 , $n=2$) en los controles. En el caso de la subpoblación CD4⁺, el promedio en ratones

transgénicos fue de 51.9 (± 5.4 , $n=3$), en contraste con 41 % (± 0.2 , $n=2$) en controles. Asimismo, la proporción de linfocitos CDS⁺ en los ratones transgénicos fue de 34.8 % (± 8.1 , $n=3$), y de 28.5 % (± 4.1 , $n=2$) en ratones control. A diferencia de lo encontrado en bazo, el promedio del coeficiente % CD4/% CDS no mostró diferencias en ganglios linfáticos ya que en ratones transgénicos fue de 1.5 % (± 0.3 , $n=3$), y en controles fue de 1.4 (± 0.1 , $n=2$).

VI.1.7. Células granulo-monocíticas (B220/Thy 1.2): Los estudios citofluorométricos en bazo revelaron que, además de la reducción en la proporción de linfocitos B, aumentaba la proporción de una subpoblación B220/Thy 1.2 con altos valores en FSC y SSC. Tales propiedades corresponden a células de tipo granulomonocítico. Por esto, se evaluó la presencia de células que expresaran Mac-1 y Gr-1 en la médula ósea de ratones F1 derivados de las líneas 4, 22 y 23; y de bazo de ratones F1 de las líneas 16, 22, y 23 (Figura 10).

El promedio del porcentaje de células Mac1⁺/Gr1⁺ en médula ósea, independientemente de la línea estudiada, fue de 68.6 % (± 10 %, $n=3$) mientras que en los controles fue de 48.8 % (± 0.8 %, $n=3$). Esto representa un aumento de 0.4 veces, el cual puede representar un aumento relativo debido a la disminución de la proporción linfocitos B220⁺ (8.2 % en transgénicos vs 30.9 % en controles).

En el bazo, el promedio del porcentaje de células Mac1⁺/Gr1⁺ independientemente de la línea fue de 32.5 % (± 12.5 %, $n=3$) versus 5.6 % en ratones control (± 5 %, $n=3$), lo cual representa una proporción 5.8 veces mayor. Estas cifras sugieren que en el bazo existe un aumento en el número absoluto de células Mac1⁺/Gr1⁺ en todas las líneas transgénicas estudiadas. Aunque no se estudió esta subpoblación en las líneas 4 y 28, los resultados obtenidos con los parámetros

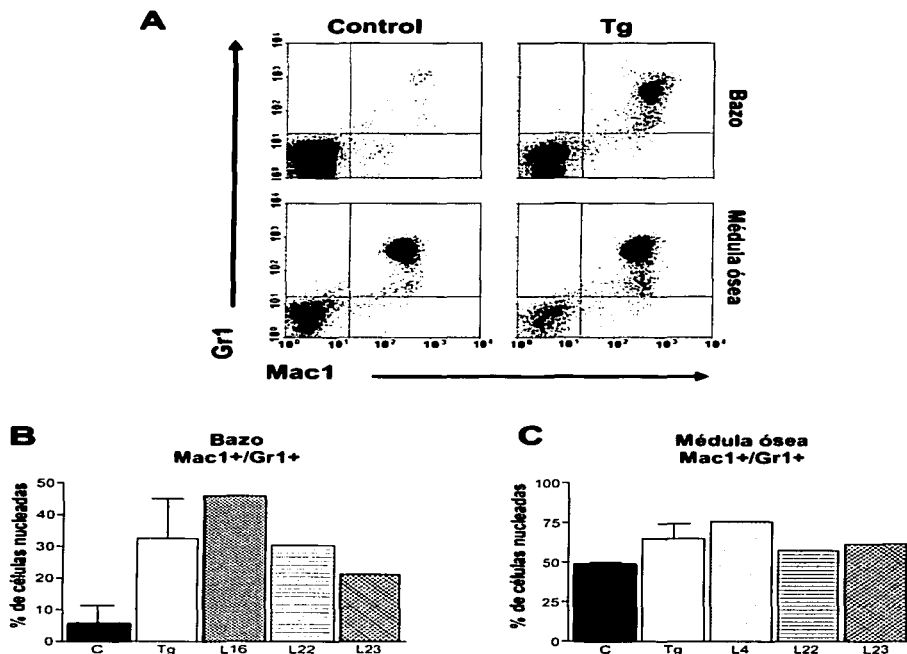


Figura 10. Células granulomonocíticas. **A)** Análisis citofluorométrico de células grano-monocíticas en bazo (*panel superior*) y médula ósea (*panel inferior*) de ratones F1 derivados de cruza entre los fundadores 22 con C57BL/6. **B)** % de células Mac1⁺/Gr1⁺ en bazo. **C)** % de células Mac1⁺/Gr1⁺ en médula ósea. Las barras representan el promedio ± D.E. de ratones control no transgénicos (*barra roja*, n=3), promedio ± D.E. de ratones transgénicos de diferente línea (*barra blanca*, n=3) y % en ratones transgénicos L16 (n=1), L22 (n=1) y L23 (n=1) (*barras azules*). Ratones F1 derivados de los fundadores 4 y 28 no fueron evaluados con los marcadores Mac 1 y Gr 1.

de FSC y SSC apoyan el hecho de que en estas líneas también se presenta un aumento en el número absoluto de células granulomonocíticas.

VI.1.8. Expresión del transgén en la superficie celular: Con la finalidad de determinar si el transgen se expresaba en la población celular deseada, así como su nivel de expresión, se tiñeron esplenocitos y células de ganglio linfático poplíteo de ratones F1, con anticuerpos anti-

B220, anti-Thy 1.2 y anti-CD154 y se analizaron por citofluorometría. La **figura 1-1A** nos muestra la expresión de CD154 por linfocitos B (B220⁺), linfocitos T (Thy 1.2⁺) y células no-T no-B (B220⁻/Thy 1.2⁻, principalmente granulocitos) de esplenocitos de ratones transgénicos y sus controles de camada. En general, el aumento de intensidad de fluorescencia en la población B220⁺ de ratones transgénicos fue sutil y homogéneo, con excepción de las líneas 23 y 28, en las cuales una pequeña población expresa CD154 con mayor intensidad.

Tomando en cuenta que CD154 no se expresa en linfocitos no activados de ratones normales y con el fin de minimizar variaciones metodológicas, se calculó el índice IMF Tg/C, entre intensidad media de fluorescencia obtenida en ratones transgénicos (IMF Tg) y la obtenida en sus controles no transgénicos (IMFC) para cada subpoblación. Entonces, un índice IMF Tg/C igual a 1.0 implica que no hay diferencias de expresión entre la subpoblación transgénica y la normal

La **figura 1-1B** muestra que el menor nivel de expresión de CD154 en linfocitos B ocurrió en la línea 4, seguido de las líneas 16 22, 28 y 23. El promedio del índice IMF Tg/C independientemente de la línea transgénicas, fue de 2.05 (± 0.46 , $n=5$, barra blanca), lo cual significa que los linfocitos B en ratones transgénicos presentan aproximadamente el doble de la fluorescencia que sus contrapartes no transgénicas.

En el caso de los linfocitos T Thy 1.2⁺ esplénicos (**Figura 1-1B**) se observó que el índice IMF Tg/C promedio de todas las líneas fue muy cercano a 1.0 (1.19 ± 0.14 , $n=5$, barra blanca), mientras que el índice IMF Tg/c para muestras sin teñir (1.23 ± 0.3 , $n=5$, barra negra). Sin

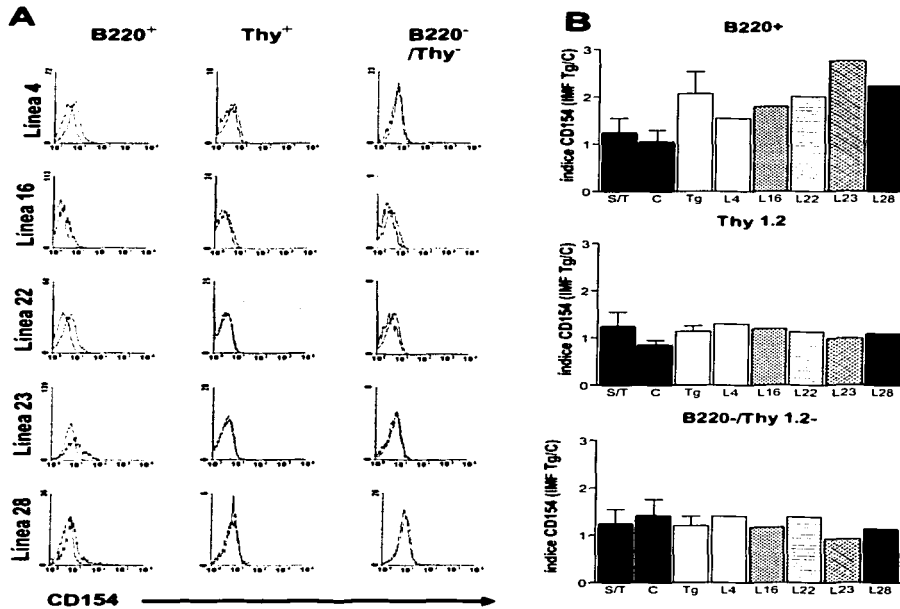


Figura 11. Expresión de CD154 en bazo. **A)** Análisis citofluorométrico de esplenocitos de ratones F1 derivados de cruces entre los fundadores 4, 16, 22, 23 y 28 con C57BL/6. Los histogramas representan la fluorescencia (FL-1) de cada subpoblación para el ratón transgénico (*trazo azul*) y el control de camada no transgénico (*trazo rojo*) de cada línea. **B)** Análisis comparativo de la expresión de CD154 en líneas transgénicas. Se muestra el cociente de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de ratón transgénico entre IMF de ratón control (IMFtg/IMFc). Como referencia se muestra el índice IMFtg/IMFc de muestras sin teñir (*barra negra*, $n=5$) y el índice IMFc entre la IMFc sin teñir (*barra roja*, $n=5$). Asimismo, se muestra el promedio del índice IMFtg/IMFc de los ratones transgénicos (*barras blancas*, $n=5$) y el IMFtg/IMFc de cada ratón de cada línea (*barras azules*, $n=1$).

embargo el índice IMF Tg/C para la población Thy 1.2 resultó mayor que el índice de la IMF de ratones control entre la IMF de muestras control sin teñir (0.84 ± 0.1 , $n=5$, *barra roja*).

De manera análoga, se observó en la población B220/Thy 1.2, un índice IMF Tg/C promedio de 1.2 (± 0.2 , $n=5$, *barra blanca*) mientras que el promedio del IMF Tg/C obtenido a partir de muestras sin teñir fue de 1.23 (± 0.3 , $n=5$, *barra negra*) (**Figura 11B**). A diferencia de lo observado en la población Thy 1.2, el índice IMF Tg/C para la población B220/Thy 1.2 resultó menor que el índice de la IMF de ratones control entre la IMF de muestras control sin teñir (1.4 ± 0.34 , $n=5$, *barra roja*).

En linfocitos B220⁺ de ganglio linfático poplíteo (**Figura 12A**) se observó un aumento homogéneo en la fluorescencia en la línea 22, mientras que en la línea 23 sólo se observó incremento de la fluorescencia en un pequeño número de eventos. En la línea 28 se observó aumento de la fluorescencia en toda la población pero fue evidente la presencia de un pequeño número de eventos con altos valores de fluorescencia, aumentando considerablemente el valor de su índice IMF Tg/C. El promedio del índice IMF Tg/C en B220⁺ fue de 3.1 (± 1.6 , $n=3$, *barra blanca*) en comparación con 1.2 (± 0.25 , $n=3$, *barra negra*) de la población sin teñir; y 1.23 (± 0.24 , $n=3$, *barra roja*) del índice de la IMF control entre la IMF de muestra sin teñir (**Figura 12B**).

En el caso de la subpoblación de linfocitos Thy 1.2⁺ de ganglio linfático (**Figura 12B**), el promedio del índice IMF Tg/C de las tres líneas estudiadas fue de 1.25 (± 0.29 , $n=3$, *barra blanca*), valor muy similar al índice IMF Tg/c de muestras sin teñir (1.2 ± 0.25 , $n=3$, *barra negra*) y del índice de la IMF control entre la IMF de muestra sin teñir (1.18 ± 0.14 , $n=3$, *barra roja*).

Por último, el promedio del índice IMF Tg/C en la población B220/Thy 1.2⁻ fue de 1.05 (± 0.25 , $n=3$, *barra blanca*) mientras que el de la población sin teñir fue de 1.2 (± 0.25 , $n=3$, *barra negra*). El índice IMF C/sin teñir fue el más alto (1.43 ± 0.16 , $n=3$, *barra roja*) (**Figura 12B**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

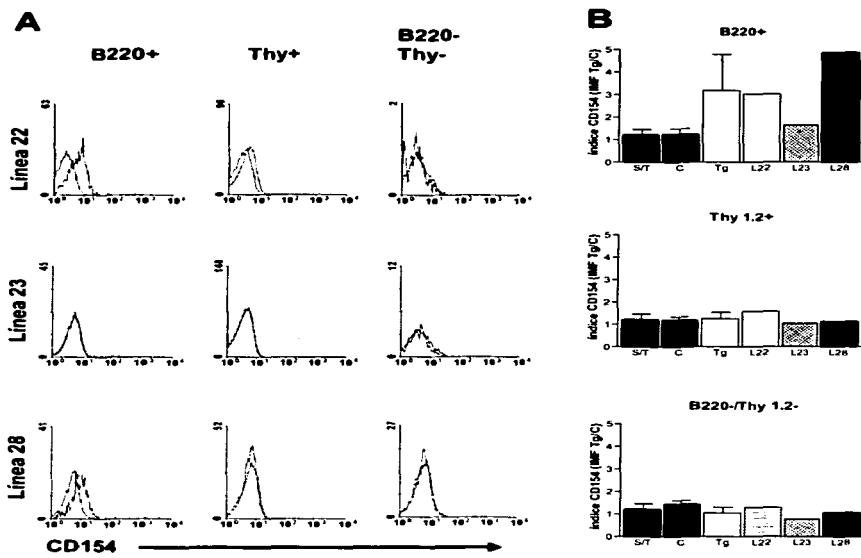


Figura 12. Expresión de CD154 en ganglio linfático. **A)** Análisis citofluorométrico de linfocitos de ganglio linfático poplíteo obtenidos de ratones F1 derivados de cruza entre los fundadores 22, 23 y 28. Los histogramas representan la fluorescencia (FL-1) de cada subpoblación para el ratón transgénico (*trazo azul*) y su correspondiente control de camada no transgénico (*trazo rojo*) de cada línea. **B)** Análisis comparativo de la expresión de CD154 en líneas transgénicas. Se muestra el cociente de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de ratón transgénico entre IMF de ratón control (IMF_{Tg}/IMF_C). Como referencia se muestra el índice IMF_{Tg}/IMF_C obtenido apartir de muestras sin teñir (*barra negra*, $n=3$) y el índice IMF_C entre la IMF_C sin teñir (*barra roja*, $n=3$). Asimismo, se muestra el promedio del índice IMF_{Tg}/IMF_C de los ratones transgénicos (*barras blancas*, $n=3$) y el IMF_{Tg}/IMF_C de cada ratón de cada línea (*barras azules*, $n=1$).

Estos resultados sugieren que la expresión de CD154 en ratones transgénicos se restringe, en la mayoría de las líneas, a linfocitos B B220⁺. Sin embargo, en esplenocitos de la línea 4 se encontró un índice IMF Tg/C mayor que el IMF Tg/C no teñido (1.29 vs 1.23 respectivamente). Así mismo, el índice IMF Tg/C en linfocitos Thy 1.2⁺ de ganglio en la línea 22 fue de 1.58 en contraste con 1.2 en muestras sin teñir. Con respecto a la población B220⁺ Thy 1.2⁻ de bazo, se encontraron índices IMF Tg/C superiores a IMF Tg/C de muestras sin teñir las líneas 4 y 22 (1.4 y 1.38, respectivamente vs 1.23) (**Figura 11B**). En ganglio linfático, sólo en las células B220⁺/Thy 1.2⁻ de la línea 22 se detectó un índice IMF Tg/C superior en las muestras teñidas que en las no teñidas (1.3 vs 1.2, respectivamente) (**Figura 12B**).

VI.1.9. Caracterización de la expresión del transgén mediante RT-PCR: Como estrategia complementaria para analizar la expresión del transgén, se efectuó RT-PCR a partir de ARN total de diferentes órganos de ratones TgCD154 y controles de camada de 4 semanas de edad de la línea 28. Mediante un protocolo con 35 ciclos de amplificación, empleando oligonucleótidos específicos para el ARNm de CD154 derivado de la transcripción del transgén, pudimos detectar amplificación del producto esperado en todos los órganos a partir de los cuales se extrajo ARN. Pensamos que dada la alta sensibilidad de la técnica, este resultado refleja la amplificación de una proporción mínima de mensajeros de CD154 proveniente de linfocitos B infiltrantes, más que la expresión aberrante en el parénquima correspondiente (**Figura 13A**).

Con el fin de obtener información semi-cuantitativa del nivel de expresión de CD154, se interrumpió el protocolo de amplificación antes de llegar a la fase de saturación. Posteriormente, los productos fueron sometidos a hibridación de Southern, por medio de la cual se detectaron señales intensas en bazo y pulmón, así como señales tenues en ganglio linfático y médula ósea pero no en hígado, riñón, músculo esquelético ni en sistema nervioso. Los oligonucleótidos empleados en este experimento no distinguen entre el mensajero endógeno y el transgénico. Como se muestra en la **figura 13B**, no detectamos expresión de CD154 en el ratón control en ninguno de los órganos analizados.

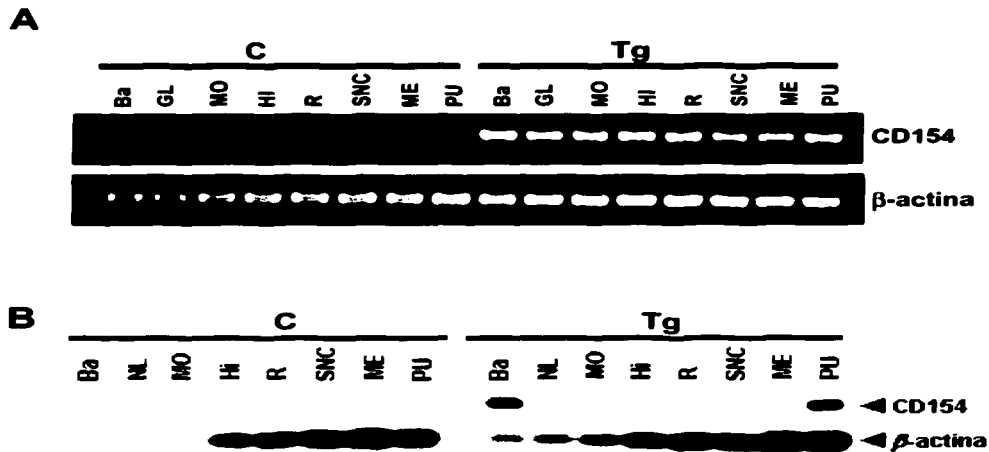


Figura 13. Expresión de CD154 por RT-PCR. Análisis de la expresión del ARNm de CD154 en ratones transgénicos (Tg) y controles de camada (C) mediante RT-PCR. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con los productos de CD154 (810pb, panel superior) y actina-β (450pb, panel inferior) después de una amplificación por 35 ciclos. **B)** Southern-blot de productos de RT-PCR de los mismos ADNc que en A, pero después de 15 ciclos de amplificación. Ba, bazo; NL, gánglio linfático; MO, médula ósea; HI, hígado; R, riñón; SNC, cerebro; ME, músculo esquelético; PU, pulmón.

VI.1.10. Análisis anatómico e histopatológico: Un hallazgo consistente en las 4 líneas ratones transgénicos en la edad adulta, fue el retraso en el crecimiento corporal en comparación con los controles de camada, observado mediante la inspección macroscópica. Tal retraso comenzó a ser evidente después de la cuarta semana de edad (**Figura 14 A**).

Después de la segunda semana de edad, la esplenomegalia fue un hallazgo muy consistente (**Figura 14A**). La hepatomegalia fue también un hallazgo constante, observada desde la etapa neonatal, aunque no muy evidente. Asimismo, los ganglios linfáticos poplíteos, axilares y mesentéricos se encontraron hiperplásicos durante las primeras 4 semanas de vida del ratón, e hipoplásicos después de las 12 semanas de edad. Tampoco se encontraron placas de Peyer en ratones adultos.

A nivel microscópico se encontró en el bazo hiperplasia de pulpa blanca, metaplasia mieloide y fibrosis con abundancia de blastos. En ganglios linfáticos se observó hiperplasia difusa (**Figura 14 B, C, y D**).

En ratones transgénicos adultos, en la mayoría de los órganos analizados por histología convencional se encontraron infiltrados linfoides. Los más patentes fueron en hígado y pulmón. En hígado, estos infiltrados fueron de predominio, intralobulillar y portal. Además, se detectaron focos de hematopoyesis extra-medular. En pulmón, los linfocitos infiltrantes predominaron en el intersticio (**Figura 14 E, F y D**). Adicionalmente, se detectaron infiltrados linfoides perineurales y periarteriolas compatibles con ganglioneuritis y vasculitis no supurativa, respectivamente. Un hallazgo consistente fue encontrar células linfoides adheridas al endotelio vascular, especialmente en hígado (**Figura 14H**). En páncreas se encontraron infiltrados intersticiales e insulinitis.

VI.1.11. Identificación de fenotipos inconsistentes: Como se describió en las secciones anteriores, se encontró un fenotipo muy consistente entre las 5 líneas transgénicas estudiadas. Sin embargo, encontramos dos casos aislados de ratones transgénicos en la F1 de la línea 22 y 4. En el caso de la línea 22 se detectó una proporción elevada de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en el bazo. En el caso de la línea 4 se detectó una proporción elevada de linfocitos B220⁺/Thy 1.2⁺.

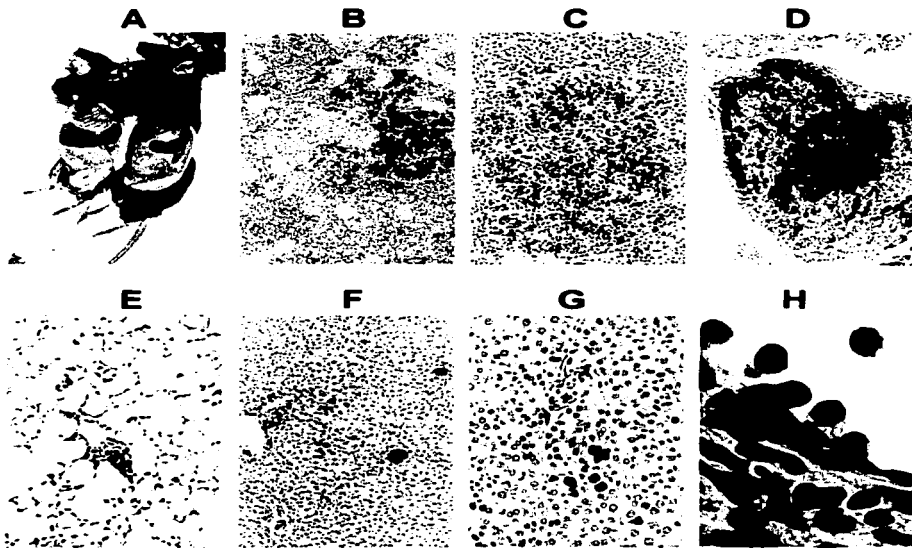


Figura 14. Análisis histopatológico. **A)** Fotografía de ratón transgénico (*izquierdo*) y control de camada de 4 semanas de edad. Nótese la diferencia del tamaño corporal y la esplenomegalia. **B)** Displasia/hiperplasia de pulpa blanca (H&E, 10X, opto 2.5); **C)** Acercamiento de pulpa blanca en donde se muestra la presencia de blastos y células granulo-monocíticas (H&E, 20X, opto 3.3); **D)** Gáanglio linfático traqueal con hiperplasia difusa y alteración de la estructura folicular (H&E, 10X, opto 4); **E)** Pulmón con infiltrados linfoides intersticiales (H&E, 20X, opto 3.3); **F)** Hígado con infiltrados linfoides portales e intersticiales, y focos hematopoyéticos (H&E, 10X, opto 4); **G)** Acercamiento de infiltrado linfoide portal e intersticial, y de focos hematopoyéticos de hígado (H&E, 20X, opto 4); **H)** Acercamiento de linfocitos adheridos al endotelio de una vena central hepática (H&E, 100X).

VI.1.12. El fenotipo observado en ratones transgénicos es dependiente de la interacción CD40-CD154: La reducción tan marcada del número de linfocitos B esplénicos, así como la interrupción de la linfopoyesis B durante la transición proB a preB en la médula ósea de los ratones transgénicos adultos no fue un resultado esperado, dada la vasta información referente a los efectos positivos sobre activación y proliferación resultantes de la señalización de CD40 en linfocitos B. Con el fin de evaluar el papel de CD40 en la determinación del fenotipo en ratones transgénicos, se retrocruzaron ratones transgénicos de CD154 derivados de la línea 28 con ratones deficientes de CD40 (CD40^{-/-})¹⁵⁸, seleccionando en la segunda generación, a los ratones transgénicos deficientes de ambos alelos de CD40 (TgCD40^{-/-}).

En la **figura 15** se muestra un análisis cuantitativo de linfocitos B de médula ósea (**Figura 15A**) y de bazo (**Figura 15B**) en ratones de los 4 genotipos resultantes de la cruce entre ratones transgénicos heterocigotos para la mutación de CD40 (CD40^{+/-}) y ratones CD40^{-/-} no transgénicos. No se encontraron diferencias significativas entre el número absoluto y la proporción de linfocitos B entre ratones CD40^{-/-} y ratones transgénicos CD40^{-/-}. En otras palabras, la ausencia del receptor CD40 previene la reducción de linfocitos B en la médula ósea y el bazo en los ratones transgénicos de CD154 CD40^{-/-}. Así mismo, la presencia de un solo alelo funcional de CD40 es suficiente para mediar la ausencia de linfocitos B en ratones transgénicos.

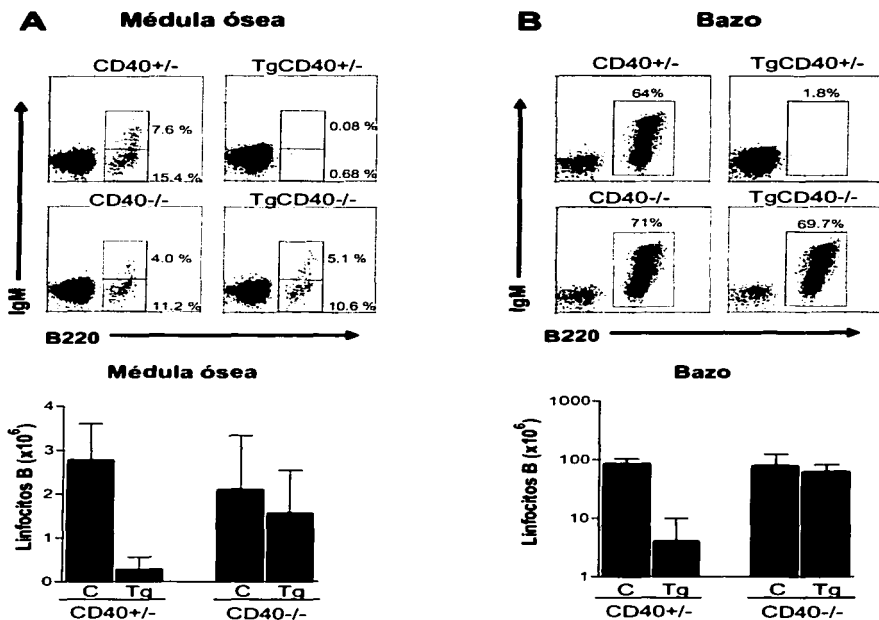


Figura 15. Dependencia fenotípica de CD40. A) Análisis citofluorométrico de linfocitos B de médula ósea en ratones transgénicos (Tg CD40^{+/-}), controles de camada (CD40^{+/-}), transgénicos deficientes de CD40 (Tg CD40^{-/-}) y no transgénicos deficientes de CD40 (CD40^{-/-}). La gráfica inferior representa el promedio \pm D.E. del número absoluto de linfocitos B220⁺ en médula ósea de dos experimentos independientes (ratones de 10 a 12 semanas de edad por cada genotipo, $n=4$). B) Análisis citofluorométrico de esplenocitos de los ratones mostrados en A. La gráfica inferior representa el promedio \pm D.E. del número absoluto de linfocitos B220⁺ en 2 experimentos independientes (ratones de cada genotipo, $n=4$).

VI. 2. Análisis del compartimiento de linfocitos B en ratones transgénicos para CD154

En la sección anterior se definió que el fenotipo resultante de la expresión transgénica de CD154 en linfocitos B de ratones adultos es dependiente del receptor CD40 y consiste en una marcada reducción de la proporción de linfocitos B en órganos linfoides secundarios, así como también una marcada reducción de la proporción de linfocitos pre B de médula ósea. En general, este fenotipo fue muy consistente en las 5 líneas de ratones transgénicos estudiados por lo cual, los estudios descritos a partir de este momento derivaron exclusivamente de la línea 28.

VI.2.1. Análisis ontogénico del número de linfocitos B: El sorprendente hallazgo de la reducción de linfocitos B periféricos y de linfocitos pre B en médula ósea a una edad fija (6-8 semanas de edad) sugiere que la generación de linfocitos B en médula ósea está impedida, lo cual resulta en la reducción de linfocitos B maduros observada en el bazo. Así, surgieron las siguientes preguntas:

¿Es el fenotipo invariable en diferentes etapas ontogénicas del ratón?

¿El defecto observado en la médula ósea se presenta en hígado fetal?

¿Existen variaciones numéricas y anatómicas de acuerdo a la edad del ratón?

Con el fin de responder a estas preguntas, se procedió a analizar en ratones transgénicos el número y el grado de maduración de linfocitos B en el bazo, hígado neonatal o médula ósea desde el nacimiento, hasta las 32 semanas de edad.

VI.2.1. Bazo: Las figuras 16, 17 B-C y la tabla II (apéndice, p 139) muestran el promedio y desviación estándar de las cuentas absolutas y porcentuales de linfocitos B en experimentos independientes con ratones neonatos (menos de 36 h después del nacimiento), y de ratones de 2 (aun lactantes), 4 (púber), 10-12 (adulto) y 32 (viejos) semanas de edad. A diferencia de los valores porcentuales de linfocitos B, las cuentas absolutas de linfocitos B mostraron alta variabilidad, principalmente en los ratones transgénicos.

En ratones transgénicos neonatos, el promedio del número absoluto de linfocitos B220⁺ esplénicos fue el doble del obtenido en los controles. Asimismo, el promedio del porcentaje de linfocitos B fue mayor en los transgénicos (**Figura 16**). En ratones transgénicos de dos semanas de edad, el promedio del número absoluto de linfocitos B fue 2 veces mayor al de ratones control (**Figuras 16, 17 B y C**). Sin embargo, en ratones transgénicos de 4 semanas de edad, el número absoluto y el porcentaje de linfocitos B disminuyó drásticamente para ser 4 y 2 veces respectivamente, menor que en los ratones control (**Figuras 16, 17 B y C**).

En ratones de 12 semanas de edad, en concordancia con los resultados previos en ratones adultos, el promedio del número absoluto y porcentaje de linfocitos B esplénicos se encontró reducido 25 y 14 veces, respectivamente. Al igual que lo observado en los ratones de 4 semanas, la reducción de linfocitos B en los ratones transgénicos fue muy marcada y constante en todos los experimentos realizados, en los cuales la menor reducción fue de 11 veces el número absoluto y la máxima fue de 150 (**Figuras 16 y 17**). Por último, en ratones de 32 semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B en ratones transgénicos fue el menor de todas las edades analizadas, siendo 3000 veces menor que en controles de camada no transgénicos (**Figuras 16 y 17**). A esta edad sólo se realizó un experimento puesto que fue difícil contar con ratones transgénicos que sobrevivieran tanto tiempo. Sin embargo, los resultados de este único experimento parecen indicar que el compartimiento de linfocitos B no se regenera, y que por el contrario se contrae conforme envejece el ratón.

Estos resultados indican que desde el nacimiento, el compartimiento de linfocitos B esplénicos en ratones transgénicos se encuentra ligeramente expandido. En ratones control, el compartimiento de linfocitos B esplénicos se expande gradualmente hasta alcanzar un máximo entre las 10 y 12 semanas para luego decaer gradualmente. En cambio, en ratones transgénicos el compartimiento de linfocitos B esplénicos se expande rápidamente hasta alcanzar un punto máximo en las primeras 2 semanas de vida, seguido de una dramática contracción entre la segunda y cuarta semana, la cual persiste progresivamente en lo que resta de vida del ratón (**Figura 17 B**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

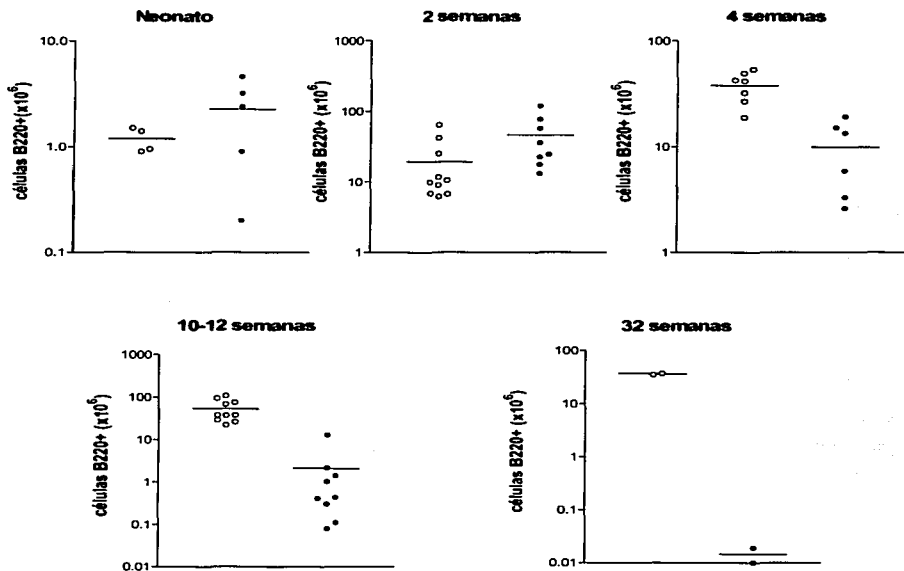


Figura 16. Linfocitos B esplénicos I. Número absoluto de linfocitos B220⁺ esplénicos en cada ratón transgénico y sus controles de camada correspondientes de acuerdo a su edad. Ratonés transgénicos (*circulos sólidos en azul*) y controles de camada no transgénicos (*circulos vacios en rojo*). Las barras horizontales representan el promedio de cada grupo. (Tabla II, apéndice. Pág 139).

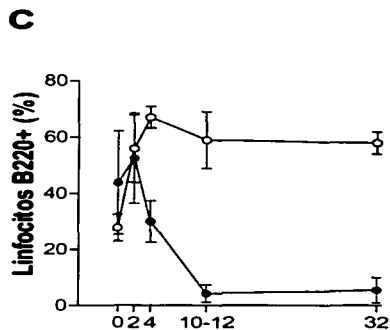
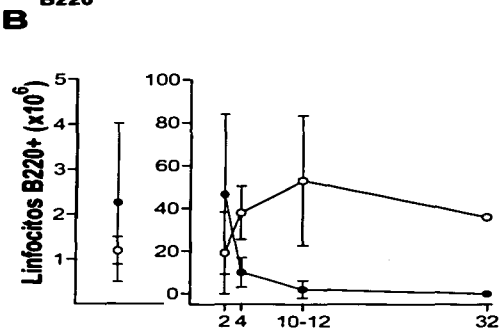
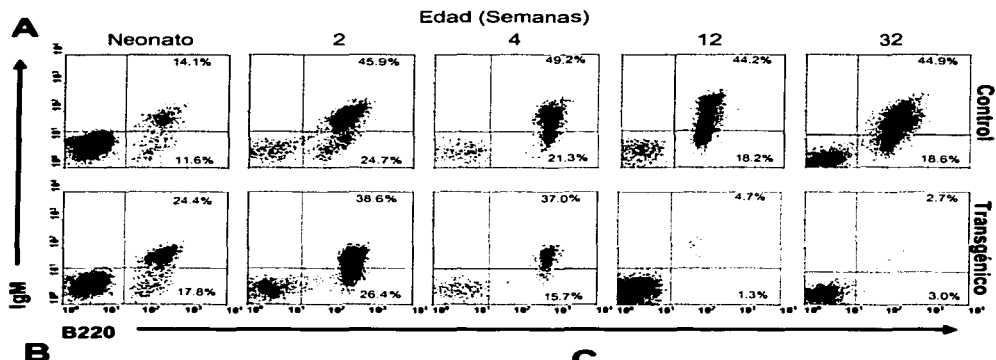


Figura 17. Linfocitos B esplénicos II. Análisis citofluorométrico de linfocitos B esplénicos. **A)** Proporción de linfocitos B (B220⁺) de bazo de ratones transgénicos (Tg, *panel inferior*) y controles de camada no transgénicos (C, *panel superior*). Los porcentajes corresponden a la proporción de linfocitos B del total de células nucleadas **B)** Número absoluto y **C)** % de linfocitos B220⁺ esplénicos de acuerdo a su edad. Ratones transgénicos (*circulos azules*) y controles de camada no transgénicos (*circulos rojos*). Las barras representan la D.E. de cada grupo. (Tabla II, apéndice, pág 139).

VI.2.3. Hígado neonatal y médula ósea: El estudio cuantitativo de la linfopoyesis B se llevó a cabo en hígado neonatal y en médula ósea de ratones de 2, 4 10 a 12 y 32 semanas de edad. En estos órganos se cuantificó el número absoluto de linfocitos B B220⁺, la proporción de los mismos que expresan IgM (**Figura 18**), así como los estadios de maduración según la clasificación de Hardy ³¹(**Figura 19**).

Como se muestra en las **figuras 18 A-C** (ver **Tabla III**, p 140), el número absoluto de linfocitos B totales (B220⁺) en hígado neonatal fue dos veces mayor en ratones transgénicos que en controles. Asimismo, la proporción de linfocitos B IgM⁺, esto es linfocitos B en estadios maduros, también fue mayor en ratones transgénicos (**Figuras 18 A-C**). Un dato adicional que apoya que los linfocitos B hepáticos de ratones transgénicos presentan un mayor grado de maduración es el alto nivel de expresión de B220 en superficie (**Figura 18D**).

El panorama en la médula ósea es muy diferente al observado en hígado neonatal. A las 2 semanas, el número absoluto de linfocitos B B220⁺ fue 4 veces menor en ratones transgénicos. Sin embargo, al igual que lo ocurrido en hígado neonatal, la proporción de linfocitos B IgM⁺ fue mayor en ratones transgénicos.

A las cuatro semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B220⁺ totales fue 20 veces menor en los ratones transgénicos. En concordancia con los resultados en los ratones adultos, a esta edad se encontró que la proporción de linfocitos maduros (IgM⁺) es menor que la de linfocitos B220⁺ que no expresan IgM. En ratones de 10 a 12 semanas, el número absoluto de linfocitos B220⁺ es alrededor de 10 veces menor que el de los controles. De igual manera, la proporción de linfocitos B IgM⁺ es marcadamente inferior a la de los ratones. A las 32 semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B es dos veces menor que en los controles. La proporción de linfocitos B IgM⁺ persistió siendo menor en ratones transgénicos. Aunque es claro que la relación entre el número absoluto de linfocitos B entre ratones transgénicos y controles tiende a igualarse conforme avanza la edad, esto se debe más a la reducción de la capacidad linfopoyética de la médula ósea de los controles asociada a la vejez ²²⁶, más que a un incremento en el número de linfocitos B en los ratones transgénicos. En términos numéricos, el número de linfocitos B220⁺ en la médula ósea de los ratones transgénicos adultos jóvenes es

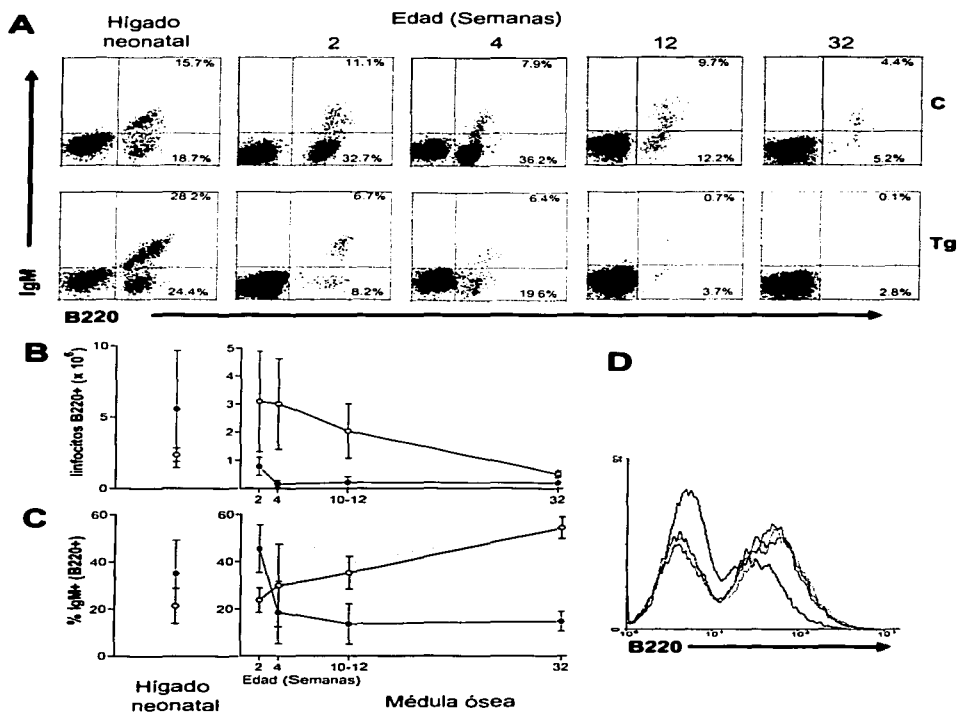


Figura 18. Ontogenia de linfocitos B. Análisis ontogénico comparativo de linfocitos B en hígado neonatal y médula ósea. **A)** Análisis citofluorométrico de células de hígado neonatal y médula ósea de distintas edades. Los porcentajes están basados en el total de células nucleadas. **B)** Promedio \pm D.E. del número absoluto de linfocitos B220⁺ en médula ósea de ratones transgénicos (*circulos sólidos*) y controles de camada (*circulos vacios*). **C)** Promedio \pm D.E. del porcentaje de linfocitos IgM⁺ de linfocitos B220⁺ totales. Ambas gráficas están basadas en la **tabla III** (apéndice, pág 140). **D)** Análisis citofluorométrico de células de hígado neonatal en el que se muestra la mayor intensidad de fluorescencia en ratones transgénicos (*trazos en color, n=3*) que en el control (*trazo negro, n=1*).

aproximadamente 2 veces menor que el de la médula ósea de un ratón control senil (**Figuras 18 A-C**).

El análisis de la linfopoyesis B según la expresión de IgM de superficie permite distinguir de manera gruesa entre linfocitos B de mayor grado de maduración (IgM⁺) de los menos maduros que no expresan IgM en superficie. Con el fin de profundizar sobre el momento de la ontogenia de linfocitos B en el cual se presenta el defecto de maduración en ratones transgénicos, se analizó la proporción y número absoluto de linfocitos proB (B220⁺/CD43⁺), preB/B inmaduros (B220^{bajo}/CD43⁺), y B recirculantes maduros (B220^{alto}/CD43⁺) por citometría de flujo, de acuerdo a lo descrito por Hardy, et al³¹ (**Figura 19**).

Como se describió anteriormente (**Figura 18 B**), el número total de linfocitos B fue siempre menor en los ratones transgénicos que en los controles en todas las edades estudiadas. Entonces, no es sorprendente que el estudio cuantitativo por etapas revelara que el número absoluto de linfocitos B, en la mayoría de las etapas estudiadas, fue también menor en los ratones transgénicos. Sin embargo, se encontraron diferencias interesantes: el número absoluto de linfocitos proB a las dos semanas de edad fue muy similar, aunque menor en los transgénicos. A las cuatro semanas de edad, el número de linfocitos proB en transgénicos disminuyó 10 veces en relación a ratones control. A las 12 semanas, estas diferencias se hacen mínimas y a las 32 semanas prácticamente desaparecen. La proporción de linfocitos pro B aumentó con la edad en ratones transgénicos, concomitantemente con la reducción proporcional de linfocitos preB/B inmaduros (B220^{bajo}/CD43⁺) y B recirculantes (B220^{alto}/CD43⁺) (ver adelante, **Figura 19 B**).

De acuerdo con lo descrito en la parte I, la etapa preB fue la más profundamente afectada en ratones transgénicos, ya que en todas las edades estudiadas, el número absoluto de linfocitos preB/B inmaduros (B220^{bajo}/CD43⁺) fue al menos 10 veces menor en los ratones transgénicos. Esta diferencia fue más acentuada a las cuatro semanas, cuando el número absoluto de linfocitos preB en los ratones transgénicos fue 50 veces menor que el de los controles (**Figura 19 C**).

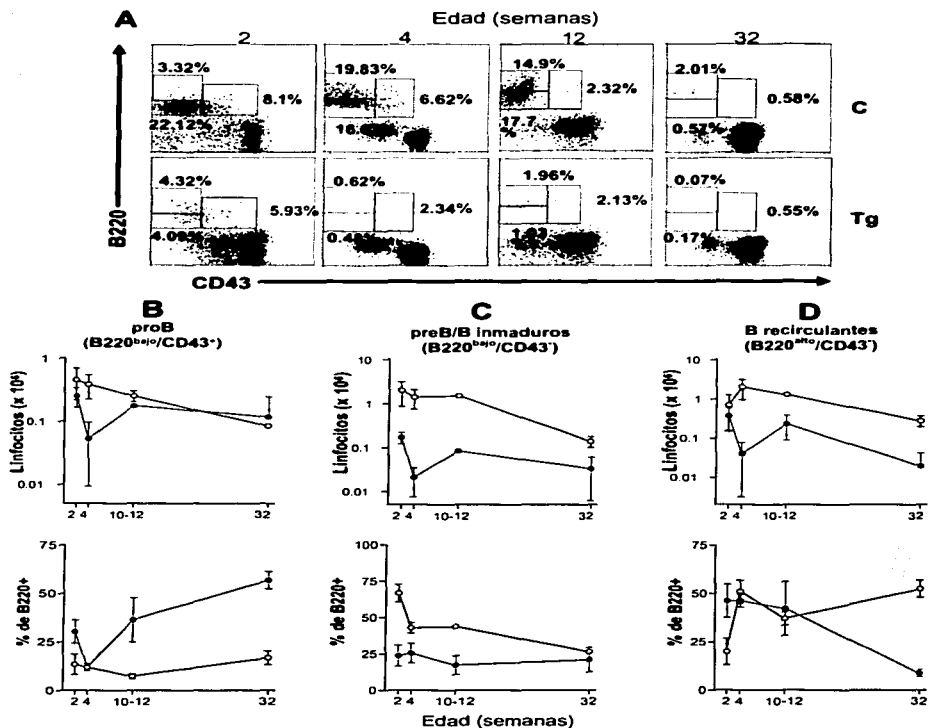


Figura 19. Ontogenia de linfocitos B en médula ósea. A) Análisis citofluorométrico de la maduración de linfocitos B en médula ósea en ratones transgénicos (*panel inferior*) y controles de camada (*panel superior*). Las cifras corresponden al % de la subpoblación enmarcada con respecto al total de células nucleadas. **B)** Promedio \pm D.E. del número absoluto (*gráfica superior*) y % (*gráfica inferior*) de linfocitos proB B220^{hajo}/CD43⁺; **C)** linfocitos preB (B220^{hajo}/CD43⁺); y **D)** linfocitos B recirculantes (B220^{alto}/CD43⁺); de ratones transgénicos (*circulos sólidos*) y controles de camada (*circulos vacios*). Las gráficas B, C y D estan basadas en la **tabla III** (apéndice, pág 140).

En lo que respecta a la subpoblación de linfocitos B recirculantes (B220^{alto}/CD43⁺), constituida por linfocitos B maduros en tránsito por la médula ósea, encontramos que a las dos semanas de edad, las diferencias numéricas entre ratones transgénicos y controles son mínimas. Al igual que lo ocurrido con las subpoblaciones proB y preB/B inmaduros, encontramos una caída máxima de linfocitos B recirculantes a las 4 semanas de edad, seguida de una modesta recuperación hacia las 12 semanas, para después disminuir progresivamente. La proporción de linfocitos B correspondiente a linfocitos B recirculantes es muy superior en los ratones transgénicos de dos semanas de edad, después de la cual sigue una disminución gradual hasta prácticamente desaparecer a las 32 semanas de edad (**Figura 19 D**).

Es de llamar la atención que en las tres subpoblaciones de médula ósea, proB, preB/B inmaduros y B recirculantes, se observó que a las 4 semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B cae a su punto más bajo, después de lo cual sigue una modesta recuperación hacia las 12 semanas para finalmente disminuir paulatinamente hacia las 32 semanas (**Figuras 19 B-D**). El significado de esta observación es incierto pero coincide con la edad en la cual normalmente cesa la linfopoyesis B esplénica. También coincide con la gran caída del número de linfocitos B esplénicos (**figura 17**).

El defecto que encontramos en ratones transgénicos ocurre alrededor de la transición proB a preB de acuerdo con Hardy, et al ³¹. Sin embargo, los marcadores de superficie utilizados para definir estas etapas han sido objeto de controversia entre diversos investigadores. Por tal motivo, fue de interés corroborar los hallazgos obtenidos con el sistema de clasificación descrito por Rolink y Melchers ¹¹. En éste, la subpoblación que equivale a la fracción B y C de linfocitos proB B220⁺/CD43⁺ de acuerdo con Hardy se denomina pre B-I y se define por la co-expresión de B220 y *c-kit* (CD117). A éste estadio de maduración le sigue el linfocito preB-II grande, que equivale a la fracción C' de Hardy y se define por su gran tamaño y la co-expresión de B220 y CD25. Como se muestra en la **figura 20**, en los ratones transgénicos se encuentran presentes la fracción A (CD24⁺/Bp-1⁻) y B de linfocitos proB (B220⁺/CD43⁺) (**Figura 20 A**), así como su equivalente funcional preB-I (B220⁺/*c-kit*⁺) (**Figura 20 B**). Sin embargo, se encuentran ausentes la fracción C de linfocitos proB y la subpoblación preB (B220^{bajo}/CD43⁺) y su equivalente funcional, la subpoblación pre B-II (B220⁺/CD25⁺) (**Figura**

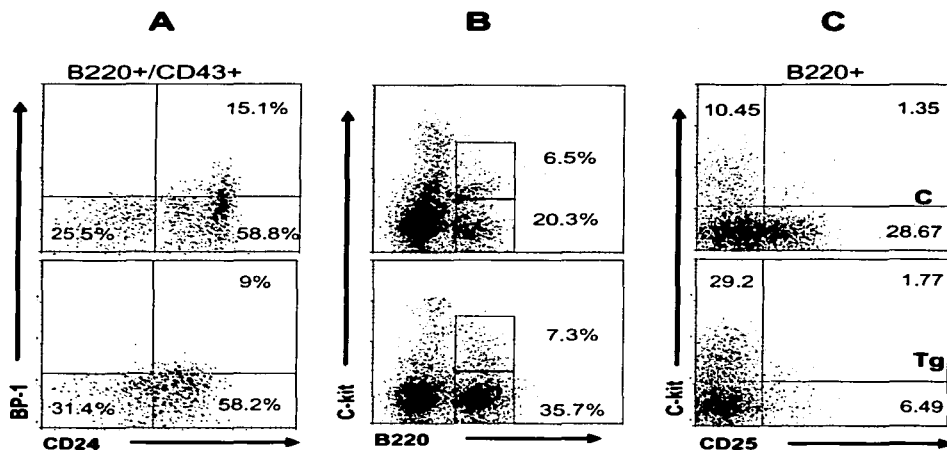


Figura 20. Caracterización de linfocitos proB. Análisis citofluorométrico de la maduración de linfocitos B en médula ósea en ratones transgénicos (Tg, *panel inferior*) y controles de camada (C, *panel superior*) mediante dos sistemas diferentes de análisis. **A)** Resolución de linfocitos proB B220⁺/CD43⁺ con anti-CD24 y anti-BP1 de acuerdo con Hardy, et al ³¹. **B)** Identificación de linfocitos preB-I (equivalente de linfocitos proB CD24⁺/BP1⁻ y CD24⁺/BP1⁺) con anti-B220 y anti-*c-kit* en células nucleadas totales, de acuerdo con Rolink y Melchers ¹¹. **C)** Identificación de linfocitos preB-II (equivalente de linfocitos proB CD24⁺/BP1⁺) en linfocitos B220⁺ en células teñidas con anti-B220, anti-*c-kit* y anti-CD25.

20 C). Entonces, mediante dos sistemas de estadificación basados en el uso de diferentes marcadores de superficie, nos fue posible comprobar que la subpoblación ausente en ratones transgénicos es funcionalmente equivalente, y corresponde a precursores de linfocitos B en los cuales ya se completaron los rearrreglos $V_{H}D_{H}J_{H}$ y se expresa el receptor pre B en la superficie celular.

Con el fin de correlacionar el fenotipo de superficie y la función de las subpoblaciones celulares afectadas dentro del compartimiento proB ($B220^{+}/CD43^{+}$), se purificaron las fracciones A, B y C de linfocitos $B220^{+}/CD43^{+}$ de médula ósea de ratones transgénicos y sus controles de camada mediante FACSsort. Las células purificadas de cada fracción fueron analizadas por citofluorometría en cuanto a las fases del ciclo celular según el contenido de ADN. La **figura 21** muestra que las células de las fracciones A y B son idénticas entre transgénicos y controles. Sin embargo, en la fracción C de ratones transgénicos se encontró una reducción de la proporción de células en fases S y G₂/M. Este hallazgo es congruente con la interrupción de la maduración de linfocitos proB hacia pre B observado en ratones transgénicos y coincide con la etapa en la cual los linfocitos proB concluyen el rearrreglo de la cadena pesada, proliferan y son seleccionados positivamente.

La mutación nula de CD40 es dominante sobre el fenotipo mediado por el transgén, sin embargo no permite aclarar el mecanismo por el cual la activación del receptor CD40 condiciona la ausencia de linfocitos B en ratones transgénicos adultos. Con el fin de definir si los precursores linfoides B en hígado neonatal y médula ósea de ratones adultos pueden interactuar con otros linfocitos B a través de CD40 y CD154, se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD40 y CD154 en ratones normales y transgénicos. La **figura 22 A** y muestra que CD40 se expresa en linfocitos B de médula ósea de ratones adultos normales en todas las etapas de su maduración definidas mediante la expresión de B220 y CD43. De manera análoga a lo observado en la médula ósea, los linfocitos proB $B220^{+}/CD43^{+}$ de hígado de ratones neonatos control y transgénicos son también $CD40^{+}$ (**Figura 22 B**). La expresión de CD40 en linfocitos ProB $B220^{+}/CD43^{+}$ normales sugiere que el fenotipo de los ratones transgénicos puede deberse a una interacción homotípica a través de CD40 y CD154. En apoyo a esta

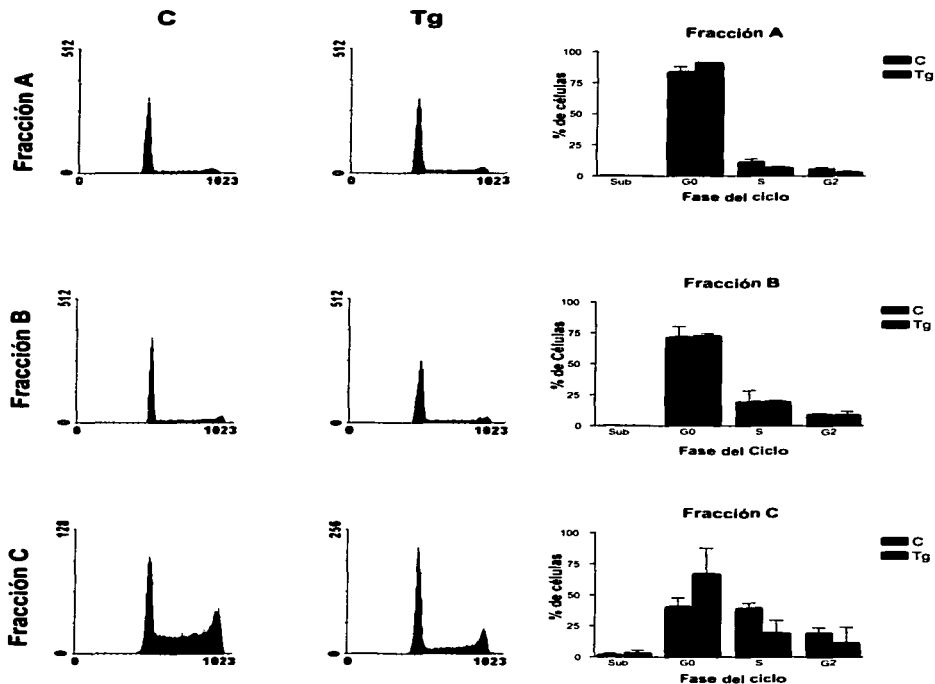


Figura 21. Ciclo celular en linfocitos proB. Las fracciones A (CD24⁻/BP1⁻), B (CD24⁺/BP1⁻), y C (CD24⁺/BP1⁺) de linfocitos proB B220⁺/CD43⁺ de ratones transgénicos (Tg) y sus controles de camada (C) fueron purificadas mediante FACSORT, luego teñidas con ioduro de propidio y analizadas por FACS en el canal FL-2. En la izquierda se muestran histogramas representativos del contenido relativo de ADN para cada fracción. En la derecha se grafica el promedio \pm D.E. de dos experimentos independientes.

hipótesis encontramos que en ratones transgénicos, CD154 se expresa en linfocitos B de hígado neonatal y proB de médula ósea de ratones adultos (**Figura. 22 C**).

En resumen, en los ratones transgénicos neonatos y de dos semanas de edad, encontramos expansión numérica de linfocitos B en el hígado y bazo respectivamente. Así mismo, se detectó que la proporción de linfocitos B que expresaban marcadores fenotípicos de maduración, fue también mayor en ratones transgénicos. (**Figuras 16-19 y Tablas II y III, apéndice, pág 139-140**). Estos resultados sugieren que la activación de CD40 en linfocitos B durante etapas ontogénicas tempranas (**Figuras 22 B y C**) resulta en un estímulo que promueve su expansión numérica y maduración fenotípica.

Por el contrario, la reducción de linfocitos proB y B inmaduros de médula ósea observada en ratones transgénicos desde las 2 semanas de edad, así como la reducción de linfocitos B maduros en bazo de ratones transgénicos adultos, sugiere que la activación de CD40 en precursores de linfocitos B de médula ósea (**Figura 22 A y C**) resulta en interrupción de su maduración, y contracción numérica del repertorio de linfocitos B en órganos linfoides periféricos. El momento ontogénico en el cual se define la dicotomía (expansión vs contracción) observada en ratones transgénicos, coincide con el cambio o "switch" de la linfopoyesis B de hígado fetal/ bazo perinatal hacia la médula ósea, órgano definitivo de linfopoyesis B en el ratón adulto.

VI.2.4. Caracterización fenotípica de linfocitos B esplénicos: Con la finalidad de definir el estado de maduración y funcional de los linfocitos B esplénicos en ratones transgénicos se determinó el fenotipo de los linfocitos B esplénicos con una serie de marcadores de superficie relacionados a diferentes estadios de maduración y otros relacionados con estados de activación. Entre estos, CD23 y Fas (CD95) se expresan en superficie celular como consecuencia de la interacción CD154/CD40.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

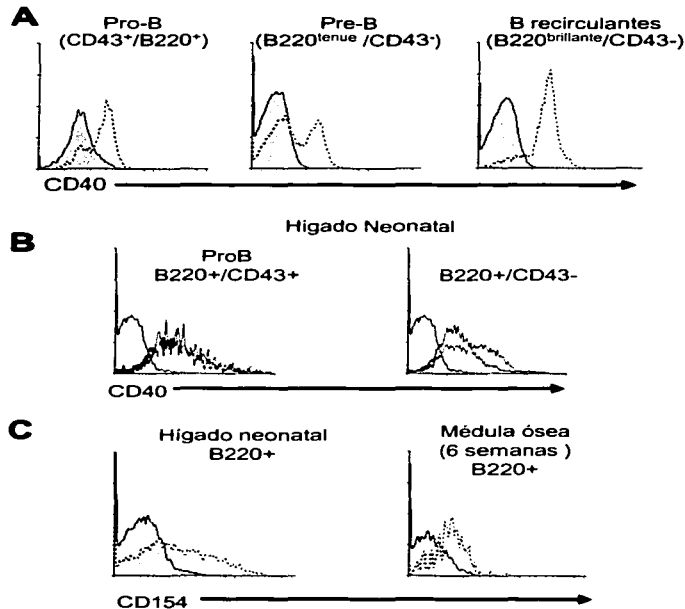


Figura 22. Expresión de CD40 y CD154. A) Análisis citofluorométrico de la expresión de CD40 en linfocitos B de médula ósea en ratones normales (C57BL6X129)F1 de 6 semanas de edad. Se muestra la fluorescencia de CD40 (*trazo punteado*) en subpoblaciones seleccionadas con base en la expresión de B220 y CD43. Los histogramas sombreados representan la fluorescencia de células de médula ósea de ratones CD40^{-/-}. B) Expresión de CD40 en linfocitos B de hígado neonatal de ratones transgénicos (*trazo azul*) y controles de camada (*trazo rojo*) de subpoblaciones seleccionadas de acuerdo a la expresión de B220 y CD43. El histograma sombreado representa la fluorescencia de células sin teñir. C) Expresión de CD154 (*trazo punteado*) en linfocitos B B220⁺ de hígado neonatal (*izquierda*) y médula ósea (*derecha*) de ratones transgénicos de 36 h post-parto y de 6 semanas de edad respectivamente. El histograma sombreado representa la fluorescencia de células sin teñir.

I-A^b (MHC clase II): Como célula presentadora de antígeno, el linfocito B expresa MHC clase II. La expresión de I-A se incrementa paulatinamente conforme avanza la edad del ratón, siendo mínima en la etapa perinatal. Así mismo, los niveles de I-A^b se incrementan en estados de activación⁷³. Como se muestra en la figura 24 A, una alta proporción de linfocitos B de ratones transgénicos expresan niveles altos de I-A^b desde las 36 h posnatales. Los niveles de I-A^b en linfocitos B de ratones control nunca alcanzaron los niveles encontrados en ratones transgénicos.

CD23 (FcεRII): La estimulación *in vitro* de linfocitos B a través de CD40, induce la expresión de CD23¹⁴⁰. En ratones normales, el inicio de la expresión de CD23 coincide con la transición de linfocito B inmaduro a maduro. Al igual que I-A^b, la proporción de linfocitos B CD23⁺ es muy baja en la etapa perinatal y se elevó conforme se incrementa la proporción de linfocitos B maduros en el bazo. En ratones transgénicos, la proporción de linfocitos B CD23⁺ se encontró aumentada notablemente durante las primeras 4 semanas de vida. Su expresión decrece hacia las 8 semanas (**Figura 23 B**).

CD5: De acuerdo con los conceptos actuales, la expresión de CD5 en linfocitos B normales se restringe a un pequeña subpoblación de linfocitos B denominada B-1a localizada en la cavidad peritoneal¹⁰⁰. Se encontró que una gran proporción de linfocitos B esplénicos de los ratones transgénicos expresaron CD5 desde las 36 horas posnatales hasta las 12 semanas de edad (**Figura 23 C**). El significado de la expresión de CD5 en linfocitos B de los ratones transgénicos será tratada con detalle más adelante.

Fas (CD90): El receptor Fas pertenece a la familia del TNF-R. No se expresa en linfocitos B en reposo pero si en linfocitos B activados en los cuales es un importante mediador de apoptosis^{155,156}. No se encontraron diferencias en la expresión de Fas en ratones neonatos. Sin embargo, en los ratones transgénicos se encontró expresión de Fas en una elevada proporción de linfocitos B a partir de las 2 semanas de edad (**Figura 23 D**).

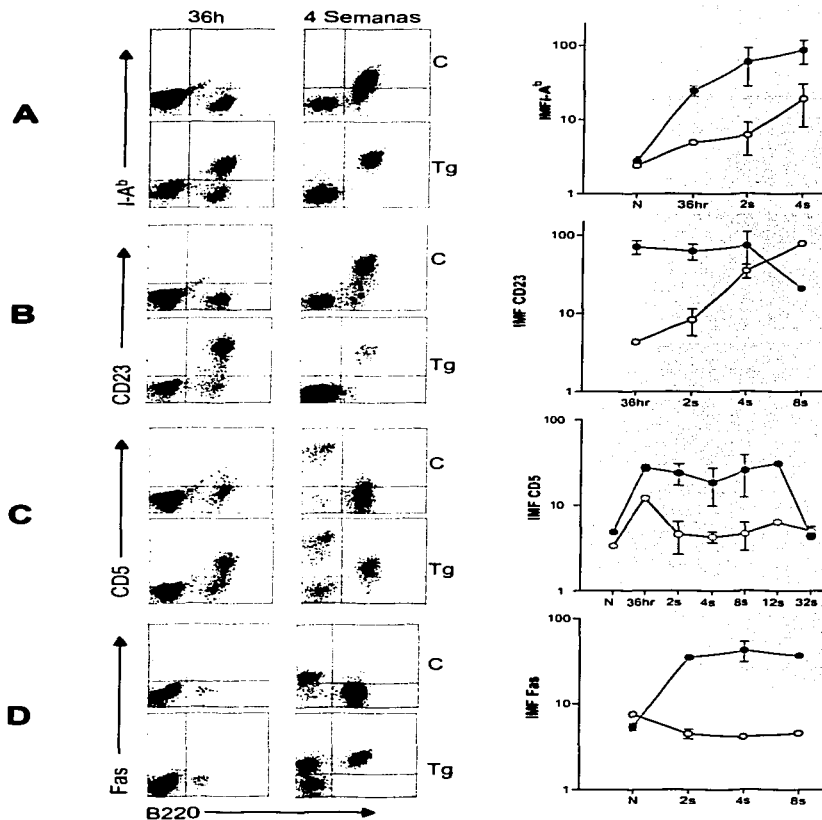


Figura 23. Caracterización fenotípica de linfocitos B esplénicos. Análisis citofluorométrico de la expresión de **A)** I-A^b, **B)** CD23, **C)** CD5 y **D)** Fas, en linfocitos esplénicos de ratones transgénicos (Tg, *circulos sólidos*) y controles de camada (C, *circulos vacíos*) a las edades señaladas. Las gráficas de la derecha representan el promedio de la intensidad media de fluorescencia de cada marcador en la población B220⁺ de un mínimo de 2 ratones de cada edad.

La sobreexpresión de I-A^b, CD23, CD5 y Fas sugiere que la interacción homotípica entre linfocitos B de ratones transgénicos induce su maduración temprana y activación. Otros datos que indican que los linfocitos B de ratones transgénicos están activados es el incremento persistente de 10 a 15 % de su volumen con respecto al de linfocitos B de ratones control de camada, evaluado según su valor en FSC (**Figura 24A**). Interesantemente, el volumen de los linfocitos T (CD5⁺/B220⁻) en los ratones transgénicos de 2 semanas de edad también fue mayor que en controles de camada. Sin embargo, esta diferencia de tamaño tendió a disminuir con la edad (**Figura 24B**). Así mismo, contamos con datos aislados obtenidos de progenie derivada de los fundadores 4 y 22 que los linfocitos B de ratones transgénicos suprimen la expresión en superficie de L-Selectina (CD62L), fenotipo asociado a estados de activación.

VI.2.5. Análisis de las fases del ciclo celular en linfocitos B esplénicos de ratones transgénicos adultos: Para determinar si el fenotipo de activación de los linfocitos B de ratones transgénicos correlacionaba con la inducción de proliferación celular, se analizaron las fases del ciclo celular de linfocitos B220⁺ y B220⁻ esplénicos de ratones transgénicos y de sus controles de camada a las dos y a las ocho semanas de edad, de acuerdo a su contenido de ADN mediante citofluorometría (**Figura 25**).

A las dos semanas de edad, la proporción de linfocitos B220⁺ en fase S o G₂/M fue 2 veces mayor en ratones control que en transgénicos. No se encontraron diferencias en cuanto a la proporción de células B220⁺ con contenido sub-diploide de ADN (células en apoptosis). En cambio, a las 8 semanas, la proporción de linfocitos B220⁺ en fase S o G₂/M fue de más del doble (aproximadamente la mitad). De acuerdo a lo esperado, la proporción de células B220⁺ con contenido sub-diploide, fue mayor en los ratones transgénicos que en los controles (**Figura 25 A**).

En el caso de los linfocitos B220⁻, se encontró tanto a las dos como a las ocho semanas de edad un pequeño incremento en la proporción de células en fases S ó G₂/M de ratones transgénicos. El significado de este hallazgo es incierto y su interpretación resulta complicada, pues la población B220⁻ en ratones transgénicos y controles no es del todo comparable ya que en

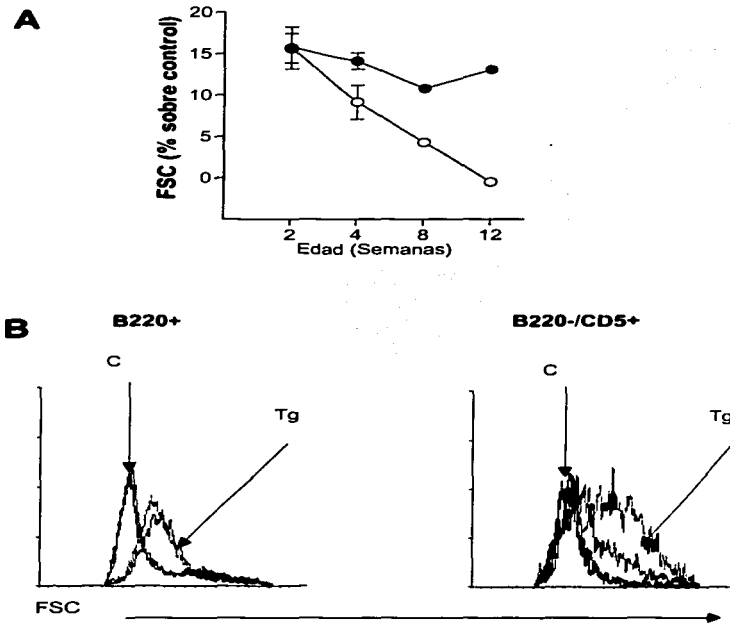


Figura 24. Volúmen celular de linfocitos. Análisis citofluorométrico del volúmen celular de linfocitos B y linfocitos T esplénicos en ratones transgénicos según la edad. **A)** Promedio \pm D.E. del porcentaje de incremento del volúmen celular relativo (FSC) en linfocitos B B220⁺ (*circulos sólidos*) y linfocitos T B220⁻/CD5⁺ (*circulos vacíos*) de ratones transgénicos con respecto al volúmen en la subpoblación correspondiente en ratones control. **B)** Histogramas representativos que muestran el incremento de volúmen (FSC) de los linfocitos B (*gráfico izquierdo*) y linfocitos T (*gráfico derecho*) de ratones transgénicos (*trazos azul y verde*) de 2 semanas de edad con respecto a su control de camada (*trazos negro y rojo*).

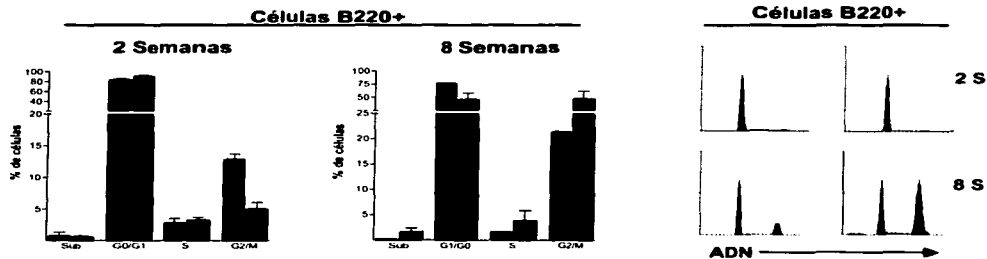
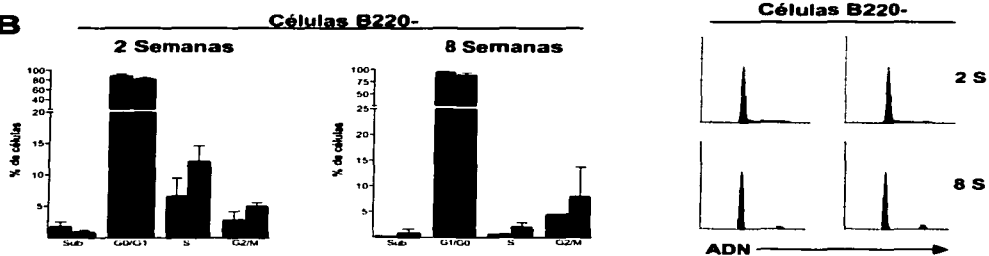
A**B**

Figura 25. Análisis del ciclo celular en linfocitos B esplénicos. A) Análisis del contenido de ADN celular en linfocitos esplénicos B220+ y B) B220-, en ratones de 2 y 8 semanas de edad. Las gráficas de barras (panel izquierdo) representan el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular. Los histogramas (panel derecho) representan la proporción celular según el contenido de ADN. Las barras representan el promedio \pm D.E. de los valores porcentuales obtenidos en un experimento a cada edad. Ratones transgénicos (barras azules, $n=3$ de 2 semanas y $n=3$ de 8 semanas) y ratones control de camada (barras rojas, $n=3$ de 2 semanas, $n=1$ de 8 semanas).

VI.2.6. Análisis de linfocitos B de cavidad peritoneal: Como se mencionó anteriormente, una elevada proporción de linfocitos B esplénicos de los ratones transgénicos expresaban CD5. Se cree que los linfocitos B-1 son derivados del hígado fetal y se mantienen por autorrenovación en la cavidad peritoneal¹⁰⁰. Ya que la cavidad peritoneal es el sitio normal de ubicación de linfocitos B CD5⁺, se decidió analizar este compartimiento en los ratones transgénicos adultos de 12 semanas de edad.

La celularidad total obtenida por lavado peritoneal fue ocho veces menor en los ratones transgénicos. Por su parte, el número absoluto de linfocitos B B220⁺ fue 180 veces menor en los ratones transgénicos, lo cual concuerda con lo observado en médula ósea y órganos linfoides periféricos de ratones adultos de la misma edad. Sin embargo, no hubo mayor diferencia en la proporción de linfocitos B que expresaban CD5 (Figura 26).

VI.2.7. Análisis del estado funcional de linfocitos B mediante la determinación de inmunoglobulina sérica: La consecuencia final de la activación de un linfocito B es su diferenciación a célula plasmática, capaz de secretar inmunoglobulinas. Como se describió anteriormente, los linfocitos B de los ratones transgénicos tienen un fenotipo de superficie sugerente de activación y en ratones adultos, una proporción considerable de estos se encuentran en fase G₂/M del ciclo celular. Para determinar si la interacción CD154/CD40 induce diferenciación de linfocitos B a célula plasmática en los ratones transgénicos, se determinaron los niveles de inmunoglobulinas séricas en ratones transgénicos y en controles de camada a las 2, 4 y 12 semanas de edad.

En ratones normales, la IgG materna persiste hasta las 8 semanas de edad. Las subclases de IgG que menos atraviesan la barrera placentaria son IgG_{2a} e IgG_{2b}. Por esta razón, en ratones de 2 semanas de edad solo se determinó IgM, IgA, IgG_{2a} e IgG_{2b}. En ratones de 4 semanas de edad, el problema de la transferencia materna se minimizó utilizando progenie de hembras transgénicas α -LG (ratones MD4) que solo tienen IgM pero no IgG en el suero. En la figura 27 (ver Tabla IV, apéndice, pág 141) se resumen los niveles relativos de inmunoglobulina sérica determinados por ELISA.

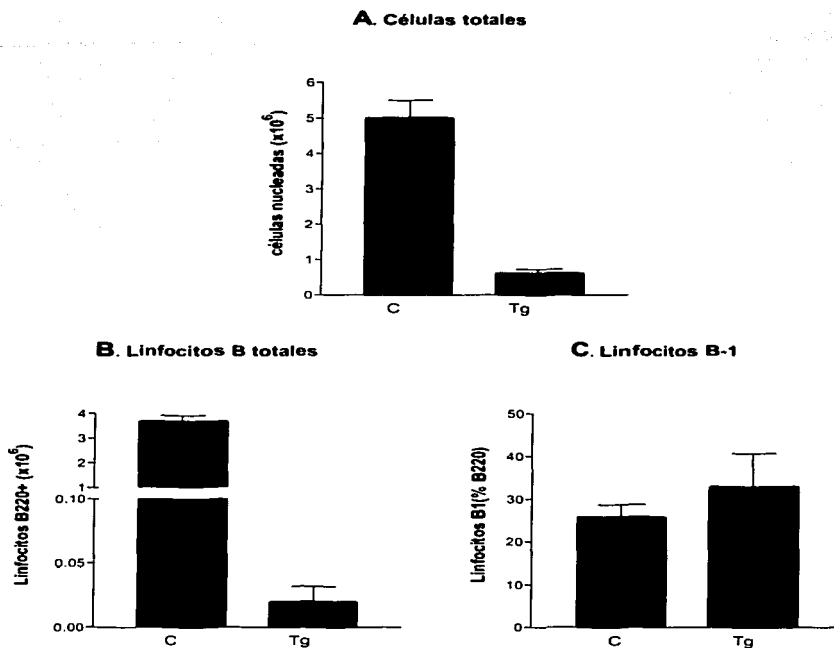


Figura 26. Linfocitos B en cavidad peritoneal. Análisis de linfocitos B en la cavidad peritoneal de ratones adultos de 12 semanas de edad. **A)** Número absoluto de células nucleadas obtenidas por lavado peritoneal. **B)** Número de linfocitos B B220⁺ totales y **C)** Porcentaje de linfocitos B CD5⁺ del total de linfocitos B, determinado mediante citofluorometría. Las barras representan el promedio \pm D.E. de un experimento. Ratones transgénicos (*barras azules*, $n=2$) y ratones control de camada (*barras rojas*, $n=2$).

En general, encontramos que los ratones transgénicos presentan niveles muy similares de inmunoglobulina a las dos y cuatro semanas de edad, seguidos por una marcada hipogamaglobulinemia, al menos desde las 12 semanas de edad. A las 2 semanas de edad, los niveles de IgM en ratones transgénicos se encontraron ligeramente elevados con respecto a los de los controles. No se detectó la presencia de IgA en ningún ratón. Los niveles de IgG_{2a} e IgG_{2b} fueron muy altos y ligeramente superiores en los ratones control. El significado de este hallazgo resulta incierto, puesto que es muy probable que gran parte de esos anticuerpos sean de origen materno.

A las 4 semanas, los niveles de todos los isotipos evaluados fueron de dos a tres veces menores en los ratones transgénicos que en los controles. A las 12 semanas, el isotipo menos afectado en los ratones transgénicos fue IgM, cuyo nivel fue cinco veces menor que en los controles. Los siguientes isotipos con menor afectación fueron IgG₁ e IgG₃, cuyos niveles fueron aproximadamente 10 veces menores en ratones transgénicos. Por último, los isotipos más afectados fueron IgG_{2a}, IgA e IgG_{2b}, cuyos niveles fueron 30, 40 y 90 veces menores respectivamente en los ratones transgénicos que en los controles (**Figura 27**).

VI.2.8. Producción de Ig en respuesta a la inmunización con un antígeno timo-dependiente: La activación de linfocitos B por el antígeno depende de la señal proporcionada por el receptor de antígeno (Ig de superficie) en respuesta al antígeno además de diversas señales co-estimuladoras entre las cuales se encuentra CD40 y/o IL-4. Debido a que los linfocitos B de ratones transgénicos ya han recibido la señal de CD40, pero los niveles basales de inmunoglobulina se encuentran bajos, se evaluó si la estimulación antigénica era capaz de inducir la secreción de anticuerpos antígeno-específicos. Para este fin, se inmunizaron ratones adultos de 8 semanas de edad con eritrocitos de carnero. Después de dos semanas se tomó el suero y se evaluó la capacidad de lisis de eritrocitos de carnero del suero en presencia de complemento exógeno.

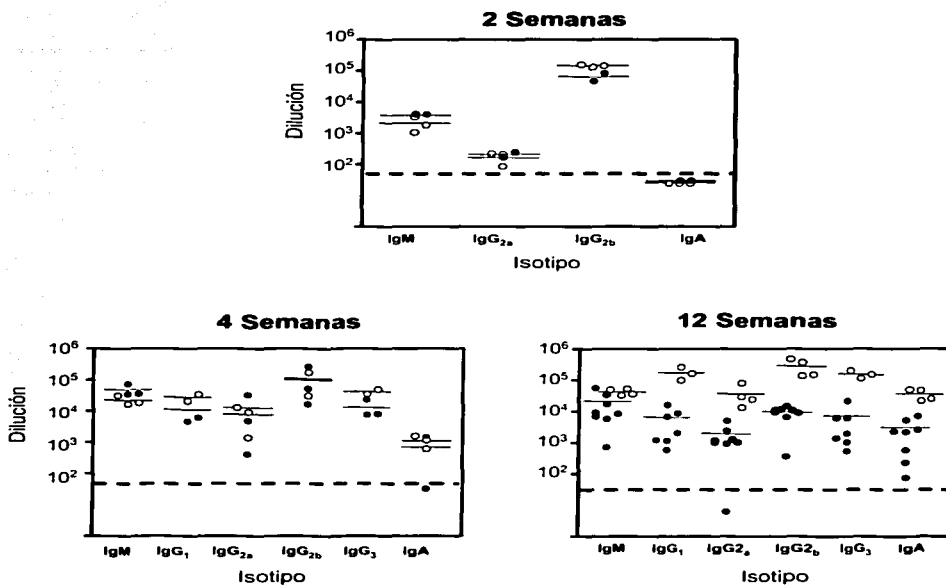


Figura 27. Niveles relativos de inmunoglobulinas séricas. Se analizó suero de ratones transgénicos (*círculos sólidos*) y controles de camada (*círculos vacíos*) de 2, 4 y 12 semanas de edad. Con el fin de evitar sobrestimación de los valores de Ig por la transferencia materna de IgG, a las 4 semanas de edad se utilizó progenie de hembras transgénicas MD4, las cuales carecen de IgG. Las barras horizontales representan el promedio por grupo de la dilución necesaria para obtener una $D.O_{(495nm)} = 0.05$ por ELISA. La línea punteada representa una dilución de 1:50 considerada como punto de corte. Las gráficas están basadas en la **tabla IV** (apéndice, Pág 141).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La **figura 28** nos muestra que los linfocitos B de los ratones transgénicos fueron incapaces de montar una respuesta de anticuerpos a los eritrocitos de carnero, un prototipo de antígeno timo-dependiente. Esto sugiere que, a esta edad, los pocos linfocitos B periféricos remanentes, aunque tienen un fenotipo de activación, son anérgicos e incapaces de diferenciarse a células plasmáticas. Una explicación alterna de la falta de respuesta a antígenos timo-dependientes es que el repertorio de linfocitos B sea tan limitado que no existan células capaces de interactuar con el antígeno.

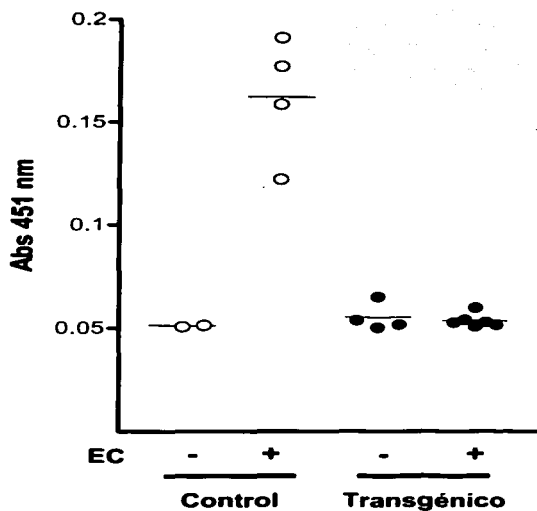


Figura 28. Respuesta humoral tímo-dependiente. Producción de anticuerpos hemolíticos en ratones control y transgénicos de 8 semanas de edad en respuesta a la inmunización intraperitoneal con eritrocitos de carnero (EC) al día cero y a los 7 días. El suero se colectó a los 12 días y la producción de anticuerpos hemolíticos se realizó mediante la incubación de suero de ratones inmunizados y no inmunizados con eritrocitos de carnero a una dilución de 1:100 en presencia de complemento humano (1:50). Se midió la liberación de hemoglobina mediante absorbancia a 451 nm.

Parte 3. Influencia del receptor de antígeno sobre el desarrollo de linfocitos B en ratones transgénicos para CD154.

En el capítulo anterior se describió como la interacción entre CD40 y CD154 en precursores de linfocitos B en hígado fetal/neonatal resulta en expansión numérica de linfocitos B durante las primeras semanas de vida, mientras que en precursores de médula ósea interrumpe su maduración. Estas alteraciones linfopoyéticas tienen como consecuencia final una marcada reducción del número de linfocitos B en órganos linfoides secundarios, hipogamaglobulinemia y falta de respuesta de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes en animales adultos.

En este punto surgen dos preguntas fundamentales derivadas de lo observado en nuestro modelo transgénico. La primera tiene que ver con la interrupción de la maduración de los linfocitos B en médula ósea durante la transición de proB a preB: ¿el efecto observado está restringido a la transición proB a preB? La segunda pregunta tiene que ver con la elevada proporción de linfocitos B CD5⁺ observada en el bazo de ratones transgénicos después del nacimiento: ¿Estos corresponden a la subpoblación B-1? De serlo, ¿El estímulo de CD40 en precursores linfoides B promueve su diferenciación hacia el linaje B-1?

VI.3.1. Efecto del transgén de inmunoglobulina rearrreglada sobre la maduración de linfocitos B en médula ósea de ratones transgénicos para CD154: La interrupción de la maduración de linfocitos B en médula ósea de ratones transgénicos coincide con la etapa en la cual ya se rearrregló la cadena VH y se ensambla el receptor preB. En ratones transgénicos para genes rearrreglados de inmunoglobulina con especificidad determinada, se previene el rearrreglo de genes de Ig endógenos por exclusión alélica, y la maduración de linfocitos B ocurre a partir de un precursor pre-proB a linfocito B inmaduro, obviando las etapas de maduración intermedias (proB y preB).

Con el fin de determinar si la eliminación de los linfocitos B en los ratones transgénicos ocurre exclusivamente durante la transición proB a preB, se cruzaron ratones transgénicos de CD154 con ratones MD4¹¹⁷, los cuales son transgénicos para una Ig de superficie con especificidad para lisozima de gallina (LG). Debido a que el transgén de Ig está rearrreglado, se previene la

recombinación de genes endógenos de inmunoglobulina, lo cual resulta en una ausencia de linfocitos proB tardíos (fracción C) y preB. Además provoca que el 95% de los linfocitos B periféricos reconozcan LG. Si sólo los linfocitos ProB tardíos/preB son susceptibles de ser eliminados mediante la activación de CD40, era posible que en ratones dobles transgénicos no hubiera eliminación de linfocitos B debido a la ausencia de las fracciones C y D, determinada por el transgén rearrreglado de inmunoglobulina anti-LG.

La **figura 29** muestra el número absoluto de linfocitos B de médula ósea y la proporción de los mismos que expresan IgM en ratones (TgCD154 x MD4)_{F1}. Como se puede apreciar, los ratones dobles transgénicos para CD154 e Ig's anti-LG de 2 semanas de edad, el número de linfocitos B220⁺ es muy similar al de los ratones TgCD154. Si bien, no contamos con el número de linfocitos B220⁺ en ratones anti-LG, por la tendencia de la curva de las 4 a las 12 semanas, se puede inferir que el número absoluto de linfocitos B220⁺ en ratones MD4 de 2 semanas de edad es igual o menor que el observado en dobles transgénicos.

A las 4 semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B220⁺ en los ratones dobles transgénicos decreció con respecto al observado a las 2 semanas de edad, y sin embargo, es similar al observado en los ratones MD4 y muy superior al de los transgénicos para CD154. Por último, a las 12 semanas de edad, el número de linfocitos B en los ratones dobles transgénicos cayó notablemente hasta llegar a los niveles observados en ratones Tg CD154.

Conforme a lo esperado, la proporción de linfocitos B que expresan IgM en ratones TgCD154/MD4 fue muy elevada entre las 2 y 4 semanas de edad. Sin embargo, a las 12 semanas esta proporción decreció hasta el nivel observado en ratones TgCD154. No contamos con los valores correspondientes para ratones MD4 de 2 semanas de edad, pero a juzgar por la tendencia de la curva, es muy probable que a 2 semanas de edad, la proporción de linfocitos B que expresan IgM sea mayor en ratones dobles transgénicos.

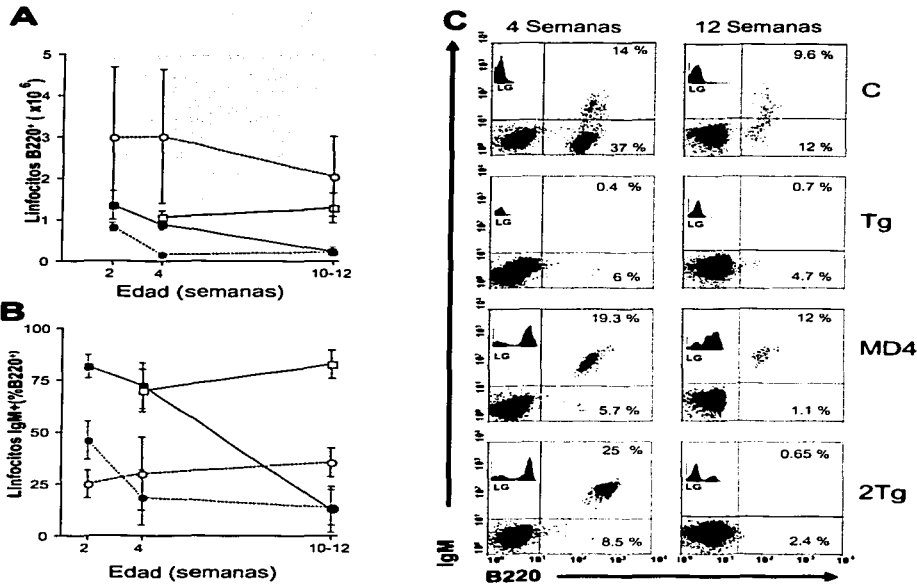


Figura 29. Linfopoyesis B en ratones CD154Tg x MD4. Análisis cuantitativo de la linfopoyesis B en médula ósea de ratones dobles transgénicos de RLB α LG y CD154. **A)** Promedio \pm D.E. del número absoluto de linfocitos B220⁺ y **B)** Promedio \pm D.E. de la proporción de linfocitos B (B220⁺) IgM⁺ en progenie F1 de ratones TgCD154x MD4. Ratones no transgénicos (C, *circulos vacios*); ratones TgCD154 (Tg, *circulos solidos*); ratones transgénicos de α LG (MD4, *cuadros vacios*); y ratones dobles transgénicos de CD154 y α LG (2Tg, *cuadros solidos*). **C)** Análisis citofluorométrico representativo de linfocitos B de médula ósea en ratones (Tg CD154xMD4)F1 de 4 y 12 semanas de edad. Se muestran los porcentajes de linfocitos B220⁺/IgM⁻ y B220⁺/IgM⁺ definidos por los cuadrantes inferior y superior derechos, respectivamente. El histograma incluido en el cuadrante superior izquierdo muestra la fluorescencia de linfocitos B220⁺ teñidos con LG-FITC.

Los resultados mostrados en la **figura 29** evidencian un retardo en la eliminación de linfocitos B de médula ósea en los ratones dobles transgénicos con respecto a los ratones TgCD154. Este retraso se reflejó en el número de linfocitos B esplénicos de los mismos ratones: A las dos semanas, el número de linfocitos B esplénicos en dobles transgénicos fue similar al de ratones no transgénicos, pero inferior al de ratones TgCD154. A las 4 semanas de edad, el número de linfocitos B en ratones dobles transgénicos alcanzó su valor máximo, similar al de los ratones no transgénicos, y superior al de los ratones MD4 y TgCD154. Finalmente, a las 12 semanas de edad, el número de linfocitos B en los ratones dobles transgénicos decreció hasta los niveles observados en los ratones TgCD154 (**Figura 30**).

Estos resultados sugieren que la eliminación de linfocitos B de médula ósea inducida por la activación de CD40 se restringe a las etapas de maduración en donde no existe aun IgM en la superficie, pues la presencia de una inmunoglobulina de superficie que omite la etapa preB también previene la eliminación de linfocitos de médula ósea de ratones dobles transgénicos. Sin embargo, también es claro que el "rescate" de linfocitos B en ratones dobles transgénicos es parcial pues se observó a las 2 y 4 semanas de edad pero no persistió en ratones de 12 semanas de edad. El hecho de que a las 4 semanas de edad, el número absoluto de linfocitos B esplénicos en los ratones dobles transgénicos sea comparable con el de ratones control y superior al de los ratones TgCD154 de la misma edad, sugiere que en los ratones dobles transgénicos, los linfocitos B también son eliminados en el bazo, de tal manera que a las 12 semanas de edad, el número de linfocitos B esplénicos está muy reducido en ratones TgCD154 y dobles transgénicos.

VI.3.1. Significado de la expresión de CD5 por linfocitos B de ratones dobles transgénicos para CD154 y receptor de antígeno anti-LG: En el sección anterior (Resultados. Parte II) se describió que los linfocitos B esplénicos de los ratones transgénicos expresan diversos marcadores como I-A, Fas y CD5, cuya expresión en la superficie es inducida por estímulos activadores ^{73, 155,156, 227}. Además de la línea 28, la expresión de CD5 por linfocitos B fue consistente en otras tres líneas evaluadas (**Figura 31**). La gran proporción de linfocitos B CD5⁺ resultó de gran interés puesto que se ha sugerido que la expresión de este marcador define a la subpoblación de linfocitos B-1, la cual secreta IgM e IgA autorreactivas en forma

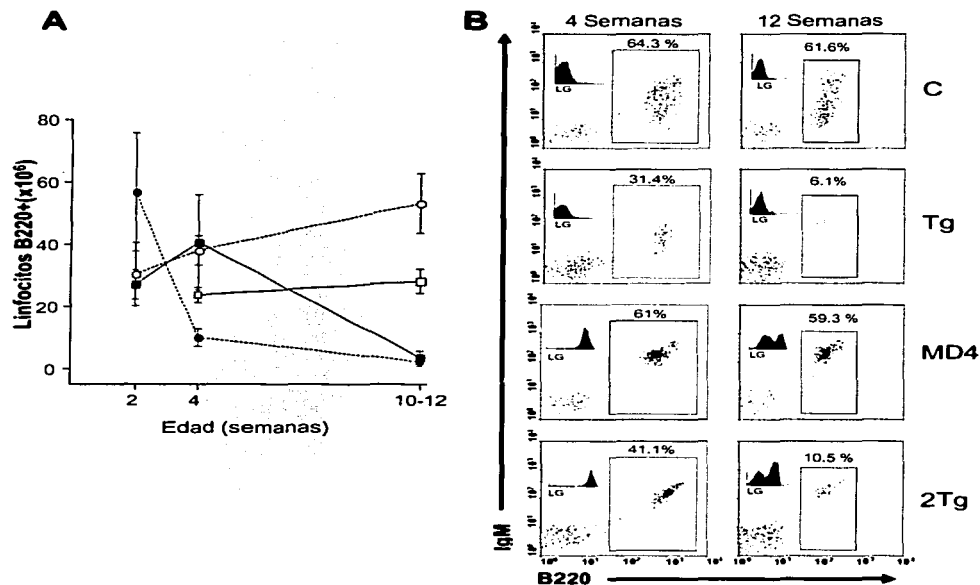


Figura 30. Linfocitos B esplénicos de ratones CD154Tg x MD4. Análisis cuantitativo de linfocitos B esplénicos de ratones dobles transgénicos CD154Tg x MD4. **A)** Promedio \pm D.E. del número absoluto de linfocitos B220⁺ en progenie F1 de ratones Tg CD154 x MD4. Ratones no transgénicos (C, *circulos vacios, linea punteada*); ratones TgCD154 (Tg, *circulos sólidos, linea punteada*); ratones transgénicos MD4 (*cuadros vacios, linea continua*); y ratones dobles transgénicos de CD154 y MD4 (2Tg, *cuadros sólidos, linea continua*). **B)** Análisis citofluorométrico representativo de linfocitos B esplénicos en ratones (Tg CD154xMD4)F1 de 4 y 12 semanas de edad. Se muestra el % de linfocitos B220⁺ definidos por la región rectangular. El histograma incluido en la esquina superior izquierda muestra la fluorescencia de linfocitos B220⁺ teñidos con LG-FITC.

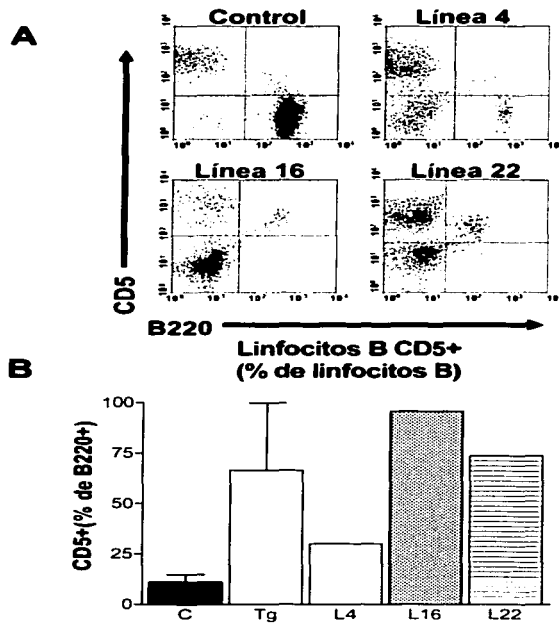


Figura 31. Linfocitos B CD5⁺ en tres líneas transgénicas diferentes. Análisis citofluorométrico de esplenocitos de ratones transgénicos F1 derivados de cruce entre los fundadores 4, 16 y 22 con C57BL/6. **A)** Gráficos representativos de la expresión de CD5 en linfocitos B B220⁺ de ratones transgénicos y un control representativo. Los F1 de la línea 23 no fueron evaluados en cuanto a la expresión de este marcador. Los resultados correspondientes a la línea 28 se describen en la figura 24C. **B)** Porcentaje de linfocitos B220⁺ que expresan CD5 en ratones no transgénicos (*barra roja, n = 3*) y F1 de ratones transgénicos (*barras azules*) de las líneas 4 (*n=1*), 16 (*n=1*) y 22 (*n=1*).

independiente de linfocitos T. Debido a que la linfopoyesis B de hígado fetal/neonatal se encontró aumentada y la linfopoyesis B de médula ósea suprimida, se consideró la posibilidad de que la interacción de CD40 con CD154 en linfocitos proB de hígado fetal podría sesgar el desarrollo de precursores linfoides B hacia el linaje B-1.

Existe evidencia experimental que sugiere que la especificidad del RLB determina el linaje que ha de tomar un precursor de linfocito B. El fenotipo de linfocitos B en ratones transgénicos para genes de inmunoglobulina rearreglada con especificidad por antígenos proteicos, como es el caso de los ratones MD4, favorece el desarrollo hacia linfocitos B-2²²⁸, mientras que en ratones transgénicos para Ig rearreglada con especificidad para antígenos fosfolipídicos y polisacáridicos corresponde predominantemente a linfocitos B-1^{101,229}.

Para determinar si los linfocitos B CD5⁺ de ratones transgénicos son en realidad linfocitos B-1, se evaluó el fenotipo de superficie de linfocitos B en ratones dobles transgénicos CD154/MD4 con especial énfasis en la expresión de CD5. De ser realmente linfocitos B-1, no habría linfocitos B expresando CD5⁺ en los ratones dobles transgénicos, puesto que la inmunoglobulina transgénica (prototípica B-2) determinaría la diferenciación de los linfocitos hacia el linaje B-2 (CD5⁻).

En la **figura 32** se muestran los resultados del análisis detallado de la expresión de CD5 en linfocitos B esplénicos en ratones (CD154Tg x MD4)F1, desde el nacimiento hasta las 12 semanas de edad. Como se puede apreciar, los niveles de expresión de CD5 en la población B220⁺ de ratones no transgénicos (C) y transgénicos MD4 fueron muy similares en todas las edades estudiadas, aunque ligeramente superiores en los ratones control. Interesantemente, los niveles de expresión de CD5 en linfocitos B de los ratones dobles transgénicos CD154xMD4 fueron muy superiores al de ratones control y MD4, pero inferiores a ratones CD154Tg (**Figura 29 A**).

Independientemente del nivel de expresión de CD5, la proporción de linfocitos B que expresan CD5 en los ratones MD4 fue menor que los ratones control. De acuerdo con lo ya descrito, los ratones CD154Tg tienen una elevada proporción de linfocitos B CD5⁺. Interesantemente, en

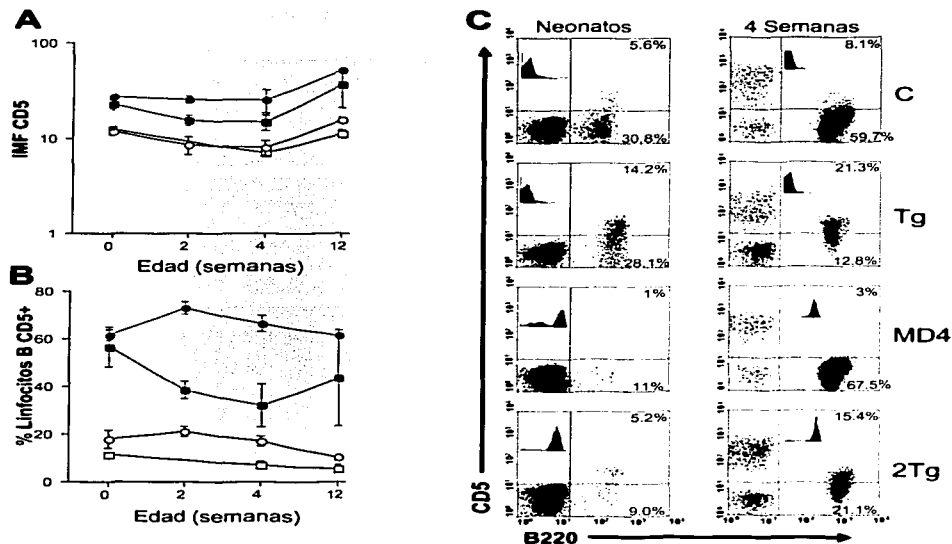


Figura 32. Expresión de CD5 en linfocitos B del bazo de ratones CD154Tg x MD4
 Análisis de la expresión de CD5 en linfocitos B esplénicos de ratones dobles transgénicos CD154 x MD4. **A)** Promedio \pm D.E. de la IMF del canal FL-2 en linfocitos B220⁺ esplénicos, y **B)** Promedio \pm D.E. de la proporción de linfocitos B B220⁺ CD5⁺, en progenie F1 de ratones Tg CD154 x MD4. Ratones no transgénicos (C, *circulos vacíos*); ratones TgCD154 (Tg, *circulos sólidos*); ratones transgénicos α LG (MD4, *cuadros vacíos*); y ratones dobles transgénicos CD154xMD4 (2Tg, *cuadros sólidos*). **C)** Análisis citofluorométrico representativo de linfocitos B esplénicos (Tg CD154xMD4)F1 neonatos y de 4 semanas de edad. Se muestra el % de linfocitos B220⁺/CD5⁻ y B220⁺/CD5⁺, definidos por los cuadrantes inferior y superior derechos, respectivamente. El histograma incluido en el cuadrante superior izquierdo muestra la fluorescencia de linfocitos B220⁺ teñidos con LG-FITC.

los ratones dobles transgénicos CD154xMD4 de cualquier edad, la proporción de linfocitos B CD5⁺ fue muy superior a la encontrada en los controles y en los MD4, pero inferior a la de los ratones CD154Tg.

En el ratón adulto normal, los llamados linfocitos B-2 son generados exclusivamente en la médula ósea, mientras que los B-1 son generados en la cavidad peritoneal. Ambos tipos celulares se originan a partir de precursores diferentes y exclusivos de cada linaje. Por esta razón, extendimos el análisis de la expresión de CD5 a linfocitos B de médula ósea de ratones (TgCD154 X MD4)_n de dos y cuatro semanas de edad. Como se puede apreciar en la **figura 33 A**, la proporción de linfocitos B CD5⁺ en los ratones TgCD154 y en los dobles transgénicos TgCD154xMD4 de dos semanas de edad fue muy superior a la encontrada en los controles. La proporción de linfocitos B CD5⁺ en dobles Tg tendió a aumentar hacia las 4 semanas de edad, mientras que en los ratones TgCD154 tendió a disminuir. La expresión de CD5 en TgCD154 y TgCD154x MD4 ocurrió a bajos niveles en linfocitos B220⁺/IgM⁻ (**Figuras 33 B y C**). Sin embargo, los linfocitos B IgM⁺ expresan CD5 a mayor densidad.

Debido a que encontramos expresión de CD5 en la población B220⁺/IgM⁻ de ratones TgCD154 y TgCD154x MD4, analizamos con mayor detalle la expresión de CD5 en las etapas de maduración de linfocitos B en etapas previas a la expresión de IgM en superficie, mediante tinciones citofluorométricas para los marcadores B220, CD43, IgM y CD5. Interesantemente, CD5 se expresó intensamente en linfocitos ProB B220⁺/CD43⁺ de ratones TgCD154 y TgCD154/MD4, pero también en linfocitos proB de los ratones control, aunque con menor intensidad (**Figuras 34 A-C**). La expresión de CD5 persistió en la etapa B220⁺/CD43⁺ en los ratones TgCD154 y TgCD154/MD4, aunque menos intensamente. Los niveles de CD5 en linfocitos B220⁺/CD43⁺ en los ratones control fueron muy bajos (**Figuras 34 B y C**). Mediante citofluorometría de cuatro colores fue posible definir que en los ratones TgCD154, los linfocitos B220⁺/CD43⁺/CD5⁺ son tanto IgM⁻ como IgM⁺. Sin embargo, en los ratones control solo los linfocitos B220⁺/CD43⁺/IgM⁻ expresan CD5 (**Figura 35**).

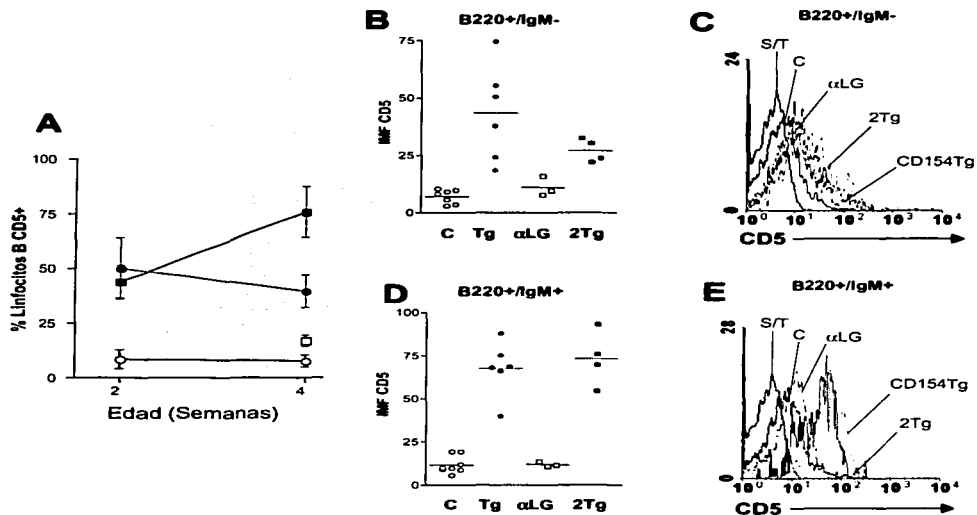


Figura 33. Expresión de CD5 en linfocitos B de la médula ósea I. Análisis de la expresión de CD5 en linfocitos B de médula ósea de ratones dobles transgénicos CD154x MD4. **A)** Promedio \pm D.E. del porcentaje de linfocitos B220⁺/CD5⁺; **B)** IMF (FL-2) de CD5 en linfocitos B220⁺/IgM⁻ en progenie F1 de ratones Tg CD154 x MD4 de 4 semanas. **C)** Análisis citofluorométrico representativo de linfocitos B220⁺/IgM⁻ de médula ósea de ratones (Tg CD154x MD4)F1 de 4 semanas de edad. **D)** IMF (FL-2) de CD5 en linfocitos B220⁺/IgM⁺ en progenie F1 de ratones Tg CD154 x MD4 de 4 semanas. **E)** Análisis citofluorométrico representativo de linfocitos B220⁺/IgM⁺ de médula ósea de ratones (Tg CD154xMD4)F1 de 4 semanas. En **A**, **B** y **D**: ratones no transgénicos (C, *circulos vacios*); ratones TgCD154 (Tg, *circulos sólidos*); ratones MD4, (αLG, *cuadros vacios*); y ratones dobles transgénicos CD154 x MD4 (2Tg, *cuadros sólidos*). En **C** y **D**: ratones MD4 y dobles transgénicos (*lineas punteadas*). En **C** y **D**: ratones control y TgCD154 (*lineas continuas*). Las etiquetas están ordenadas de menor a mayor IMF (en sentido de las manecillas del reloj).

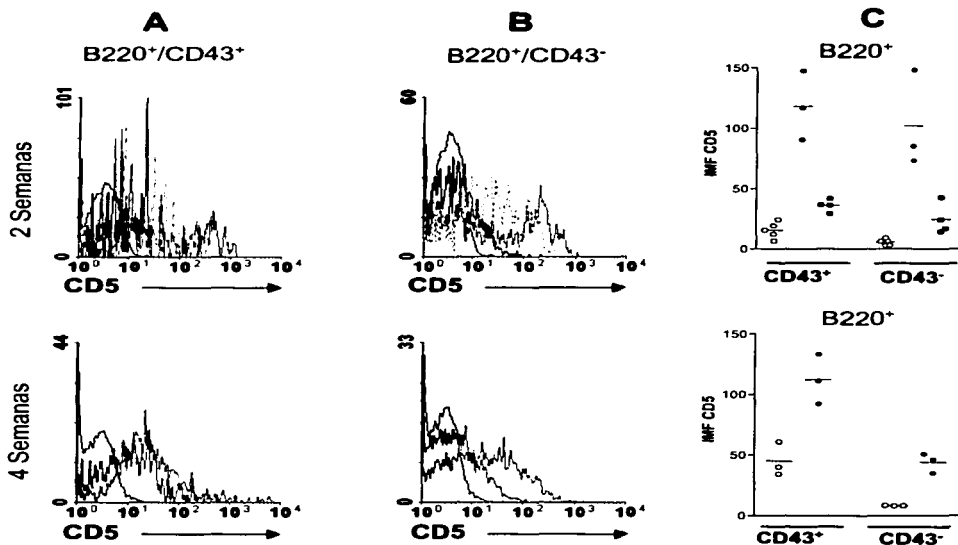


Figura 34. Expresión de CD5 en linfocitos B de la médula ósea II. Análisis de la expresión de CD5 en linfocitos B de médula ósea de ratones (TgCD154x MD4)F1. **A)** Análisis citofluorométrico de tres colores que muestra la expresión de CD5 (FL-2) en linfocitos proB B220⁺/CD43⁺ de ratones de 2 (*panel superior*) y 4 (*panel inferior*) semanas de edad. **B)** Análisis citofluorométrico de tres colores que muestra la expresión de CD5 (FL-2) en linfocitos B B220⁺/CD43⁻ de ratones de 2 (*panel superior*) y 4 (*panel inferior*) semanas de edad. **C)** IMF (FL-2) de CD5 en linfocitos B220⁺/CD43⁺ y B220⁺/CD43⁻ en ratones de 2 (*panel superior*) y 4 (*panel inferior*) semanas de edad. En **A** y **B**: ratones MD4 y dobles transgénicos (*trazo punteado*); ratones control y TgCD154 (*trazo continuo*). En **C**: ratones no transgénicos (C, *círculos vacíos*); ratones TgCD154 (Tg, *círculos sólidos*); y ratones dobles transgénicos TgCD154xMD4 (2Tg, *cuadros sólidos*).

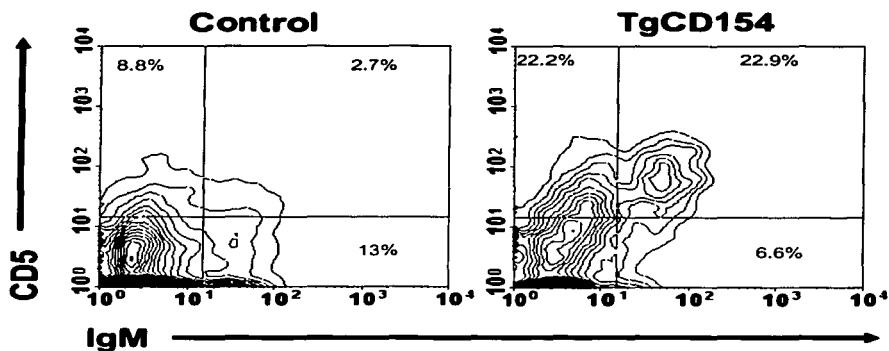


Figura 35. Expresión de CD5 en linfocitos preB B220^{bajo}/CD43⁻. Análisis citofluorométrico de 4 colores que muestra la expresión de CD5 en linfocitos B B220⁺/CD43⁻ de médula ósea de ratones control y TgCD154 de 4 semanas de edad. Los cuadrantes superior e inferior izquierdo (cuadrantes IgM⁻) corresponden a la fracción D de acuerdo con Hardy ³¹ (B220^{bajo}/CD43⁻/IgM⁻/IgD⁻), mientras que los superior e inferior derechos (IgM⁺) corresponden a las fracciones E y F (B220^{bajo}/CD43⁻/IgM⁺/IgD⁻ y B220^{alto}/CD43⁻/IgM⁺/IgD⁺, respectivamente).

VI.3.3. Evaluación de la producción de anticuerpos anti-fosfatidil colina en ratones transgénicos: La producción de anticuerpos anti-fosfatidilcolina (anti-FC), los cuales son producidos únicamente por la subpoblación B-1⁹⁹. En ratones normales, los anticuerpos anti-FC constituyen un gran porcentaje de los niveles de IgM basales y su secreción aumenta en forma inespecífica en respuesta al lipopolisacárido (LPS)²³⁰. Para descartar en forma concluyente que los linfocitos B CD5⁺ en los ratones transgénicos fueran B-1, se evaluó la producción de anticuerpos séricos IgM e IgA anti-FC en respuesta al tratamiento con LPS *in vivo*.

Como se muestra en las **figuras 36 A y B**, los niveles de IgM anti-FC en suero (expresados como intensidad media de fluorescencia) de los ratones control no tratados con LPS, es aproximadamente 30 veces mayor que el de eritrocitos bromelinizados incubados únicamente con anticuerpo secundario (fluorescencia basal, línea punteada en la **figura 36 A**, histograma (B) en la **figura 36 B**). El nivel de IgM anti-FC en suero de los ratones control tratados con LPS fue aproximadamente 300 veces mayor que el valor de fluorescencia basal. En el caso de la IgA, los niveles de anticuerpos anti-FC detectados fueron menores que para IgM, pues se puede detectar un nivel basal (3 veces superior a la fluorescencia basal) y un aumento de cerca de 20 veces su valor relativo en respuesta a LPS (**Figura 36 C**). Sin embargo, en ratones transgénicos para CD154, no se detectó la presencia de anti-FC clases IgM ni IgA en suero de ratones sin tratar o tratados con LPS.

Las **figuras 36 A-D** muestran también los niveles de IgM e IgA anti-FC en ratones transgénicos MD4 y en dobles transgénicos para CD154 y MD4. Como era de esperar, los niveles de IgM anti-FC basales y en respuesta a LPS en ratones MD4 se encontraron por debajo de ratones control no transgénicos, aunque si se secretan en pequeñas cantidades. En cuanto a los niveles de IgA en ratones MD4 se observaron niveles basales muy reducidos y prácticamente no se detectó incremento en respuesta a LPS. En los ratones dobles transgénicos, al igual que en los ratones transgénicos para CD154, los niveles de IgM e IgA anti-FC fueron prácticamente indetectables.

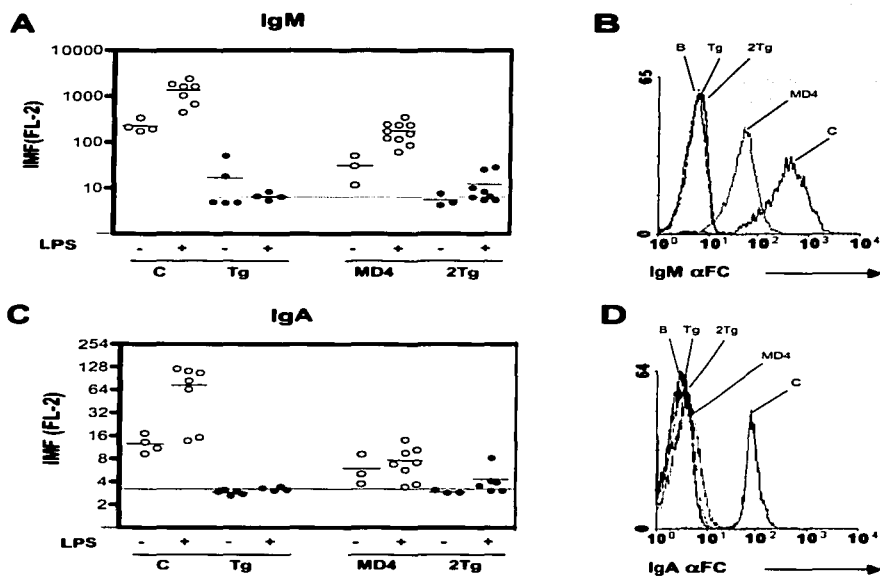


Figura 36. Producción de anticuerpos anti-FC. Determinación de anticuerpos anti-fosfatidilcolina (α FC) por citofluorimetría. **A)** Determinación de niveles relativos de IgM α FC en suero de ratones control (C), TgCD154 (Tg), transgénicos α LG (MD4) y dobles transgénicos α LG/CD154 (2Tg) tratados (+) o sin tratar (-) con LPS. La línea punteada representa la fluorescencia basal de eritrocitos bromelinizados. **B)** Histograma de la fluorescencia emitida por eritrocitos bromelinizados incubados con suero de ratón de cada genotipo y revelado con α IgM murina de conejo biotinilado, seguido de una incubación con estreptavidina-PE. Como control negativo (B) se utilizaron eritrocitos bromelinizados incubados con α IgM/EA-PE. **C y D)** Determinación de IgA α FC en suero de los mismos ratones que en A y B. La edad de los ratones en ambas determinaciones fue de 6 a 8 semanas.

VII. Discusión

En este trabajo se estudiaron las consecuencias de la expresión constitutiva de CD154 en linfocitos B por medio de transgénesis en ratón. El propósito general fue definir si la señal provista por CD154 (señal 2) era capaz de activar linfocitos B autorreactivos que normalmente son tolerizados al reconocer el autoantígeno (señal 1) en etapas tempranas del desarrollo en el órgano linfóide primario, o bien, una vez maduros en la periferia.

Sorprendentemente, en ratones transgénicos adultos encontramos una reducción promedio de 25 veces el número absoluto de linfocitos B en bazo. Los pocos linfocitos B periféricos mostraron marcadores fenotípicos de activación, sin embargo, los ratones presentaron hipogamaglobulinemia e incapacidad para efectuar respuestas inmunes humorales T-d o T-i. La reducción del número de linfocitos B fue dependiente de la interacción CD154/CD40 y se acompañó de una interrupción de la linfopoyesis B en médula ósea, durante la transición de linfocito proB B220⁺/CD43⁺/CD24⁺ a linfocito preB B220⁺/CD43⁺/IgM⁻. En contraste con los hallazgos encontrados en animales adultos, el número de precursores de linfocitos B de hígado fetal se encontró elevado. Adicionalmente, se encontraron infiltrados inflamatorios en diversos tejidos.

VII.1. Validación del modelo: Aunque la transgénesis ha sido ampliamente utilizada en biomedicina para el estudio de diversos fenómenos biológicos, en ciertas ocasiones pueden resultar fenotipos aberrantes no atribuibles al transgén *per se*. Estos efectos no deseados pueden ocurrir debido a que el experimentador no tiene control sobre el sitio de inserción ni el número de copias del transgén que se insertarán en el genoma. En el mejor de los casos, el transgén se puede insertar en una región no codificante transcripcionalmente silenciosa, por lo que no se alterará la expresión de genes endógenos y la expresión del transgén estará determinada exclusivamente por el elemento regulador seleccionado por el experimentador. En cambio, si el transgén se inserta en una región con alta densidad de genes, se puede alterar el patrón de expresión de los genes endógenos o bien, la expresión del transgén puede estar sometida a elementos reguladores endógenos^{231,232}.

Por tales razones, es conveniente obtener varias líneas transgénicas independientes (por probabilidad, cada línea representa una inserción en diferente locus), con el fin de corroborar que el fenotipo es debido al transgén y no al efecto de la inserción.

En este trabajo se obtuvieron diez fundadores, a partir de los cuales se establecieron cinco líneas transgénicas cuyo fenotipo fue muy consistente. Cinco fundadores murieron antes de dejar progenie, y pensamos que el fenotipo fue muy similar pero probablemente más intenso. Dentro de las cinco líneas estudiadas se encontraron ligeras variaciones en la intensidad de la expresión del transgén, lo cual no correlacionó con el número relativo de copias del transgén. Sin embargo, fue posible detectar expresión de CD154 en linfocitos no B en las líneas 4 y 22.

Los resultados de la evaluación de la expresión del transgén por citofluorometría deben de interpretarse con cautela debido a que la expresión de CD154 es muy leve y la sensibilidad de la técnica no permite una gran resolución. No fue posible descartar que haya habido expresión en otras subpoblaciones e incluso en otros tejidos. Debido a que el anticuerpo utilizado no distingue entre el CD154 codificado en el transgén y el endógeno, tampoco se descarta una probable contribución a la expresión del CD154 endógeno. Los estudios de expresión del ARN mensajero de CD154 tampoco permiten concluir si en la línea transgénica utilizada no ocurrió expresión ectópica, es muy probable que las señales de amplificación obtenidas por RT-PCR en hígado, riñón, o pulmón reflejan la expresión del transgén por linfocitos infiltrantes.

A pesar de las variaciones encontradas en la expresión del transgén y la ocurrencia de fenovariantes aisladas, el fenotipo observado en las líneas 16, 23 y 28 no parece depender de el sitio de inserción del transgen. Asimismo, en ausencia de CD40, el fenotipo no se manifiesta, lo cual demuestra que el fenotipo no es resultado de toxicidad del transgén por alteración en la regulación transcripcional del linfocito B por el uso de un promotor quimérico compuesto del enhancer intrónico de locus κ con el promotor $V\kappa$, o bien por el uso de secuencias heterologas como el intrón de la globina β humana o la región 3' no traducida del gen de la queratina 14 humana.

VII.2. Efectos de la expresión de CD154 en linfocitos B y sus repercusiones en el compartimiento de linfocitos B: La consecuencia más notoria de la expresión de CD154 en linfocitos B fue la marcada reducción del número absoluto de linfocitos B periféricos que se observó en animales transgénicos adultos de entre 6 a 12 semanas de edad. Tal reducción no fue constante a lo largo de la vida del ratón, pues el número absoluto de linfocitos B esplénicos en ratones transgénicos se expandió a más del doble durante las primeras semanas de vida, para luego decrecer rápidamente.

Nosotros proponemos que la causa de la expansión del compartimiento de linfocitos B esplénicos observada en ratones transgénicos en las primeras semanas de vida postnatal se debió al estímulo proliferativo inducido por la estimulación de CD40 en conjunto con estímulos derivados de la señalización del RLB. Esta suposición se basa en la observación de que los linfocitos B de ratones transgénicos expresaron marcadores de activación asociados a la activación vía CD40 (MHC clase II y CD23) desde las 36 h postnatales, y a que durante el periodo neonatal, la mayor parte del repertorio de linfocitos B tiene reactividad con autoantígenos¹⁰⁰. Respaldando este concepto, se encuentra el hecho de que en los ratones dobles transgénicos CD154-Tg x MD4, los cuales tienen un repertorio monoclonal y el antígeno específico está ausente, la máxima expansión del compartimiento de linfocitos B esplénicos ocurrió hasta la cuarta semana de edad y fue menos intensa.

Las causas de la dramática contracción del compartimiento de linfocitos B esplénicos observada en ratones CD154Tg entre la segunda y cuarta semanas de edad, carecen aún de una explicación satisfactoria. Los linfocitos B hepáticos y esplénicos de ratones CD154Tg expresaron CD5, pero no Fas, al menos 36 h después del nacimiento. Sin embargo, los linfocitos B esplénicos expresaron altos niveles de Fas en su superficie a partir de las dos semanas de edad, momento en el cual se encontró la máxima expansión del compartimiento de linfocitos B.

Dado que la activación de CD40 en linfocitos B los induce a expresar Fas y los sensibiliza a morir por apoptosis^{155,156}, nuestros resultados sugieren que durante las primeras semanas de vida, los linfocitos B de los ratones transgénicos son sensibilizados a morir por apoptosis

mediante el estímulo de CD40 y la consecuente expresión de Fas, para ser finalmente eliminados por una célula FasL⁺. Los linfocitos T eliminan linfocitos B autorreactivos en el bazo mediante un mecanismo dependiente de la interacción Fas-FasL^{112,113}. Asimismo, la reducción del compartimento de linfocitos B periféricos observada en nuestro modelo es semejante a la depleción de linfocitos B periféricos observada en humanos con enfermedad de injerto contra huésped (EICH)^{233,234}, así como en modelos murinos de EICH, en los cuales se ha destacado la importancia de los linfocitos T del donador en la eliminación de linfocitos B del huésped en forma dependiente del sistema Fas/FasL y perforina^{235,236}. Entonces, es probable que los linfocitos B de ratones CD154Tg activados vía CD40 sean eliminados por linfocitos T mediante Fas/FasL, perforina, o ambos.

El hecho de que los linfocitos B transgénicos no sean eliminados hasta después de la segunda semana, se explica por el hecho de que durante el periodo perinatal normal, el número de linfocitos T esplénicos es muy bajo y se incrementa paulatinamente hasta las ocho semanas de edad, momento en el cual alcanza su nivel definitivo²³⁷. El papel de los linfocitos T en la contracción del compartimento de linfocitos B en ratones CD154 Tg podría ser definido mediante cruza de CD154Tg con ratones deficientes de linfocitos T (TCR β)²³⁸ o mediante timectomía neonatal de ratones CD154 Tg; mientras que la participación de Fas y de perforina, se podría diseccionar mediante la cruce de ratones CD154 Tg con ratones deficientes de Fas (*gld* o *lpr*)²³⁹ y de perforina²⁴⁰, respectivamente.

Podría argumentarse que la contracción del compartimento de linfocitos B periféricos observada en nuestro modelo transgénico se deba a la falta de flujo de nuevos linfocitos B provenientes de médula ósea (ver abajo), lo cual podría ocurrir si la vida media de los linfocitos B esplénicos a esta edad fuera muy corta (de días a un par de semanas). Sin embargo, los estudios de marcaje *in vivo* con BrdU, así como la supresión total de linfopoyesis B mediante inactivación condicional de Rag 2 a partir del nacimiento, revelan que la vida media de los linfocitos B periféricos murinos, ya sean foliculares, de zona marginal o B-1, es de más de 4 meses²⁴¹⁻²⁴³. Entonces, la contracción del compartimento B en ratones CD154-Tg parece deberse a un proceso activo de eliminación, más que a una falta de ingreso proveniente de la médula ósea. De cualquier forma, es muy probable que la ausencia de ingreso de linfocitos B

de médula ósea contribuya a la ausencia de linfocitos B esplénicos después de las 4 semanas de edad, lo cual requerirá de estudios de marcaje *in vivo* con BrdU para estimar la vida media y velocidad de recambio de los linfocitos B en nuestro modelo.

VII.3. Efectos de la activación de CD40 en linfocitos proB de médula ósea: El hallazgo de una deficiente maduración de los linfocitos B durante la transición de linfocito proB a preB en médula ósea de ratones transgénicos acaparó nuestra atención, puesto que sugería consecuencias novedosas derivadas que la activación de CD40 en linfocitos proB.

Previamente, Castigli, *et al*¹⁶⁷, reportó que CD40 no se expresa en linfocitos proB de médula ósea de ratón. Contrariamente, nosotros y otros²⁴⁴, describimos que CD40 se expresa en linfocitos proB B220⁺/CD43⁺. Una explicación probable de esta discrepancia es que los ratones utilizados en el estudio de Castigli, *et al*¹⁶⁷ fueron ratones Rag 2^{-/-}, los cuales carecen de linfocitos preB (B220⁺/CD43⁺/IgM⁺) y las fracciones B y C de linfocitos proB debido a la incapacidad de realizar recombinación D→J y V→DJ⁴². Entonces, es probable que la fracción de linfocitos proB B220⁺/CD43⁺ que expresa CD40 sea la fracción C (B220⁺/CD43⁺/CD24⁺/BP1⁺).

Por su parte, los linfocitos proB CD10⁺/CD34⁺/μ⁻ humanos expresan CD40. Estos linfocitos proliferan en respuesta a IL-7, efecto que es inhibido por anticuerpos agonistas anti-CD40 *in vitro*¹⁶⁶. Los mecanismos por los cuales CD40 inhibe la proliferación de linfocitos proB humanos se desconocen hasta el momento, y en este estudio no se estudió si la falta de proliferación estaba asociada a apoptosis.

Hasta el momento desconocemos el mecanismo preciso por el cual el desarrollo linfoide B en médula ósea es interrumpido durante la transición de linfocito proB a preB. Demostramos que los linfocitos proB normales expresan CD40 y que en ratones transgénicos, el transgén se expresa en la misma etapa, lo cual resulta inesperado, debido a que en condiciones normales, el inicio de la transcripción en el locus κ (transcritos estériles) ocurre en la etapa preB^{245,246}.

Independientemente de las causas que promueven la expresión temprana del transgen, la eliminación de precursores linfoides durante la transición proB a preB puede deberse a por lo menos dos mecanismos diferentes: El primero es un mecanismo directo, en el cual la activación de CD40 en el linfocito proB resulta en la eliminación de la célula que recibió el estímulo (eliminación en cis). El segundo es un mecanismo que involucra una tercera célula (una célula estromal, por ejemplo), la cual recibe la señal de CD40 y en consecuencia libera un factor que elimina al linfocito proB (eliminación en trans). A continuación se describen algunas posibilidades:

Es posible que la señal de CD40 en linfocitos proB de médula ósea ejerza efectos positivos tal como lo hace en la periferia. La activación a través de CD40 activa las vías de ERK/MAPK, JNK/ SAPK y PI₃-K¹⁸⁷⁻¹⁹². Al menos ERK/MAPK y PI₃K están implicadas en la señalización a través del receptor preB⁷⁰⁻⁷², por lo que es probable que la señalización derivada del receptor preB, que normalmente representa un estímulo de selección positiva, sea potenciada por la activación concomitante de CD40, resultando en selección negativa, tal como lo hace un auto-antígeno en linfocitos B inmaduros. En otras palabras, el efecto de la señalización a través de CD40 en linfocitos proB es el de "sensibilizar" (o reducir el umbral de activación) al receptor PreB, de tal forma que las interacciones de baja afinidad con ligandos presentes en el microambiente de la médula ósea resultan en apoptosis por sobre-estimulación, en lugar de selección positiva⁵⁰. Esta explicación es congruente con los hallazgos obtenidos en diferentes modelos murinos caracterizados por la reducción del umbral de activación del RLB, como lo son la deficiencia de SHP-1 (ratón motheaten viable), CD22, y de CD72, o en ratones que sobreexpresan CD19; en los cuales se observa reducción del compartimiento de linfocitos B periféricos y bloqueo de la maduración de linfocitos B en médula ósea⁷⁵⁻⁷⁸⁻⁸⁰.

Esta propuesta es particularmente interesante, pues está de acuerdo con el papel central del RLB y moléculas asociadas en la determinación del destino del linfocito B. La expresión de CD5 en linfocitos B depende de señales del RLB pero no de CD40²⁴⁷⁻²⁴⁹, sin embargo se desconoce si la señalización del receptor preB induce la expresión de CD5. Hasta el momento se desconoce la función de CD5, pero su asociación con la fosfatasa SHP-1 se ha implicado en la regulación negativa de la señalización a través del RLT y RLB en linfocitos T²⁵⁰ y en

linfocitos B-1^{251, 252}, respectivamente, así como en la selección positiva y negativa en timocitos²⁵³⁻²⁵⁵.

Interesantemente, nosotros encontramos que el 10 % de linfocitos preB B220⁺/CD43⁺/IgM⁺ de ratones normales son CD5⁻, proporción que aumenta a un 30 % en linfocitos preB B220⁺/CD43⁺/IgM⁺ de los ratones TgCD154. Entonces, es probable que la fracción de linfocitos preB B220⁺/CD43⁺/IgM⁺/CD5⁺ en ratones normales refleje la fracción de linfocitos preB sujeta a selección positiva. En cambio, en los ratones transgénicos, la señalización concomitante a través de CD40 potencia la señalización del receptor preB, seleccionando negativamente a la mayoría de los linfocitos preB, y aumentando tanto la proporción de células CD5⁺, como la densidad de expresión de CD5 en la superficie de los linfocitos preB que no fueron seleccionados negativamente.

Apoyo adicional a la propuesta de que CD40 potencia las señales derivadas del preRLB proviene de estudios en ratones dobles transgénicos CD154 x MD4, en los cuales se detectó un aumento de la expresión de CD5 en linfocitos B220⁺/IgM⁺ y B220⁺/CD43⁺, así como el aumento en el número absoluto de linfocitos B220⁺ de médula ósea a las 2 semanas de edad con respecto a l de ratones CD154-Tg, lo cual interpretamos como un aumento en la selección positiva promovido por la potenciación de la señalización del receptor α LG en ausencia del antígeno específico.

La hipótesis de que la eliminación de linfocitos B durante la transición pro-B a pre-B observada en ratones CD154-Tg se debe a una "sensibilización" del receptor preB requerirá de experimentos futuros para ser confirmada. Un enfoque interesante sería determinar la consecuencia de mutaciones en los componentes del receptor preB asociadas a un aumento en el umbral para su activación. Los ratones deficientes de Syk presentan una interrupción en la transición de linfocito proB a preB^{44,45}. Tal como CD40, Syk está implicado en la activación de las vías ERK/MAPK, JNK/ SAPK y PI₃-K. Entonces, podríamos hipotetizar que el defecto de la maduración de linfocitos B observado en ratones CD154-Tg podría ser corregido por la ausencia de Syk, o bien, que el defecto de la maduración observado en ratones Syk^{-/-} podría ser compensado por la expresión constitutiva de CD154 en linfocitos B. El análisis de las cruzas

de los ratones CD154 Tg con ratones mutantes *xid*^{256,257}, *Btk*^{-/-}^{258,259}, *BLNK*^{-/-}⁷⁶ o *Igβ*^{-/-}⁴³ podrían contribuir a validar esta hipótesis.

Un mecanismo alternativo que puede explicar la eliminación de linfocitos proB en cis, es que la activación de CD40 mediante interacciones homotípicas entre linfocitos proB desencadene señales pro-apoptóticas. Sin embargo, el receptor CD40 carece de dominios de muerte característicos de otros receptores de la superfamilia del TNF-R; lo cual hace improbable esta posibilidad. No obstante, la inducción de apoptosis a través de CD40 ha sido descrita para ciertas líneas tumorales de origen epitelial²⁶⁰. A su vez, se han descrito diversos efectos de regulación negativa mediados por CD40 en linfocitos B: la señalización vía CD40 inhibe la diferenciación terminal de linfocitos de centro germinal hacia célula plasmática²⁶¹; induce inhibición de la proliferación en linfocitos B tonsilares humanos, así como linfocitos B tumorales e hibridomas²⁶²⁻²⁶⁴.

Otro mecanismo probable que podría explicar la eliminación de linfocitos B en médula ósea, sería que, de manera análoga a lo que se ha propuesto para los linfocitos B periféricos autorreactivos, la señal de CD40 induzca la expresión de Fas en el linfocito proB de médula ósea, pudiendo éste ser eliminado por alguna célula que exprese FasL¹¹³ (inducción de muerte en *trans*). Por el momento desconocemos si los mecanismos de eliminación de linfocitos B autorreactivos que operan en la periferia ocurran durante la linfopoyesis B de médula ósea. Así mismo, desconocemos si en la médula ósea existen células que expresen FasL.

Alternativamente, la señal de CD40 puede ser recibida por células del estroma o del endotelio vascular, suprimiendo la secreción de factores linfopoyéticos o bien induciendo la expresión de factores supresores de la linfopoyesis B como IFN γ ²⁶⁵ y TGF- β ²⁶⁶ o citotóxicos como el TNF α (inducción de muerte celular en *trans*). Estudios de expresión de múltiples citocinas por ensayo de protección de RNAsa no apoyan esta posibilidad²⁶⁷. Sin embargo, para descartar efectos en *trans*, sería necesario transferir precursores de linfocitos B derivados de ratones CD40^{+/+} mezclados con precursores de linfocitos B derivados de ratones CD154-Tg CD40^{-/-} a ratones irradiados CD40^{-/-} o CD40^{+/+}. Si el mecanismo de eliminación de linfocitos B es en *trans*, podríamos encontrar linfocitos B CD40⁺ maduros en ratones receptores CD40^{-/-}, pero no

en ratones receptores CD40^{+/+}. Si el efecto de eliminación es en *cis*, no encontraríamos linfocitos B CD40⁺ maduros en ratones receptores, independientemente de la presencia o ausencia de CD40 en el ratón receptor.

¿Porqué los linfocitos preB de médula ósea son eliminados, mientras que los de hígado fetal son expandidos? Existe evidencia suficiente para establecer que la linfopoyesis B de hígado fetal es diferente a la de la médula ósea en el adulto. Una diferencia crucial parece ser la ausencia de expresión de TdT en precursores fetales, lo cual limita la diversidad del repertorio, y lo enriquece de ciertas especificidades que reconocen con baja afinidad a autoantígenos y antígenos extraños involucrados en las repuestas T-independientes^{69,91}. Estos linfocitos de origen fetal, también denominados B-1, son seleccionados positivamente por autoantígenos y son resistentes a apoptosis mediada por Fas^{268,269}. Es posible que la capacidad de los linfocitos de origen fetal de ser seleccionados positivamente por autoantígenos, en combinación con el co-estímulo a través de CD40, es lo que promueve una expansión inicial del compartimento B perinatal en ratones CD154 Tg.

VII.4. Implicaciones de la expresión transgénica de CD154 en la segregación de linajes de linfocitos B y la tolerancia inmunológica: La motivación principal de este trabajo fue determinar si una señal co-estimuladora como la activación de CD40 podía salvar a un linfocito autorreactivo de ser seleccionado negativamente o anergizado por los mecanismos naturales de tolerancia inmunológica. Irónicamente, no pudimos documentar autoinmunidad, debido a los bajos niveles de anticuerpos séricos. Sin embargo, el hallazgo de que una elevada proporción de los linfocitos B de ratones CD154-Tg expresan el marcador CD5 en superficie llamó nuestra atención, puesto que CD5 es un marcador de linfocitos B-1, los cuales secretan anticuerpos que reaccionan con auto-antígenos (auto-anticuerpos naturales)^{69,91}.

La especificidad del RLB juega un papel determinante en la segregación de las subpoblaciones de linfocitos B. La expresión transgénica de RLB con especificidad prototípica de cada subpoblación favorece la diferenciación de la subpoblación correspondiente²²⁸. Dentro de este contexto, si los linfocitos B CD5⁺ de ratones CD154Tg fueran verdaderos linfocitos B-1, la

expresión transgénica de un receptor de especificidad prototípica B-2 impediría la diferenciación de linfocitos B-1, y no sería posible encontrar linfocitos B CD5⁺ periféricos.

Nosotros encontramos una alta proporción de linfocitos B CD5⁺ específicos para la LG (antígeno prototípico B-2) en bazo y médula ósea de los ratones dobles transgénicos TgCD154/MD4. Tal como en ratones TgCD154, los linfocitos B de ratones TgCD154/MD4 expresaron además, altos niveles de I-A y Fas, y CD23. La reducción de linfocitos B foliculares y la presencia de linfocitos B con fenotipo de activación y marcadores de linfocitos B-1 también ha sido descrita en ratones transgénicos MD4 deficientes de SHP-1 (motheaten^y MD) ²⁷⁰. De manera similar, los linfocitos autorreactivos anérgicos de ratones dobles transgénicos anti-LG/LG soluble expresan altos niveles de CD5 en superficie, y la deficiencia de CD5 revierte el estado anérgico ²⁷¹. En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente la noción de que la expresión de CD5 está relacionada más al estado de activación, que a la diferenciación hacia un linaje determinado y que CD5 está involucrado en la regulación negativa de la señalización del RLB en linfocitos B autorreactivos.

Recientemente, se describió un modelo murino transgénico en el cual se expresó CD154 en linfocitos B. Estos ratones, a diferencia de nuestro modelo, presentan títulos altos de IgG anti-ADN, asociado a depósito de complejos inmunes y glomerulonefritis, característicos de LES, lo cual también es dependiente de la presencia de CD40 ²⁷⁸. Estos resultados pueden parecer contradictorios con los descritos en el presente trabajo. Sin embargo, es posible que las diferencias fenotípicas entre ambos modelos se deban a el momento e intensidad de la expresión de CD154, debido a que se utilizaron elementos reguladores diferentes en la construcción del transgén. Adicionalmente, la expresión de un nuevo miembro de la SFTNF denominado BLYS/TALL-1 en ratones transgénicos bajo el control transcripcional del promotor de actina, también induce expansión clonal de linfocitos B y autoinmunidad ²⁷⁹.

VII.5. Papel biológico de CD40 en la ontogenia temprana de linfocitos B: No nos fue posible demostrar que la presencia de ARNm de CD154 en la médula ósea de ratones normales, lo cual indica que la interacción entre CD40 y CD154 no es un mecanismo que opere en la selección negativa de linfocitos preB o B inmaduros autorreactivos en condiciones

normales. Creemos que el valor de los resultados obtenidos mediante la estimulación de linfocitos proB vía CD40 es que apoyan, en forma indirecta la idea del papel fundamental del umbral de activación del RLB en el destino de los linfocitos B.

Si en la médula ósea de ratones normales no hay expresión de CD154 ¿Cuál es el significado biológico de la expresión de CD40 en linfocitos proB? En diversas enfermedades infecciosas bacterianas y virales crónicas, un número considerable de linfocitos T CD4⁺ activados permanecen en la médula ósea. Podemos especular que en estas condiciones, los linfocitos T CD4⁺ activados pudiesen modificar la linfopoyesis B a través de interacciones CD154/CD40. El bloqueo de la maduración de linfocitos B podría representar una consecuencia ventajosa en el caso de infecciones por virus linfotrópicos, al reducir el número de células que son el blanco de la replicación viral.

Por último ¿Cuál es la aplicación práctica de los hallazgos de este trabajo? Como se mencionó anteriormente, tanto en humanos como en ratones que presentan EICH existe una contracción del compartimiento de linfocitos B periférico mediado por linfocitos T activados del donador ²³³⁻²³⁶. Así mismo, se ha descrito que una causa que contribuye a la depleción del compartimiento de linfocitos B, es la eliminación de precursores linfoides B tempranos mediada por linfocitos T activados derivados del donador ²³³⁻²³⁵. El bloqueo de la interacción CD154/CD40 previene el desarrollo de EICH en ratón ^{272,273}. Tomando en cuenta nuestros resultados, sería importante determinar en modelos experimentales apropiados, si el bloqueo de la interacción CD40-CD154 previene también la supresión de la linfopoyesis B. En caso afirmativo, el bloqueo de la interacción CD154/CD40 en el terreno clínico podría ofrecer beneficios terapéuticos importantes en pacientes que sufren de EICH.

Por otro lado, resultaría muy interesante evaluar el efecto de la señalización a través de CD40 en linfocitos B leucémicos. Pensamos que por analogía a la etapa ontogénica, los linfocitos derivados de leucemias proB humanas podrían ser particularmente sensibles a ser eliminados después de ser activados a través de CD40. Este conocimiento nos podría llevar al desarrollo de nuevas estrategias más selectivas de erradicación tumoral.

VIII. Conclusiones

1.- Los ratones transgénicos de CD154 presentan un fenotipo consistente, dependiente de CD40.

2.- La señalización a través de CD40 en precursores linfoides B de hígado neonatal promueve su expansión, mientras que en precursores de médula ósea induce eliminación, lo cual indica que los efectos de la señalización de linfocitos B a través de CD40 dependen de la etapa ontogénica y la ubicación anatómica.

3.- La activación de linfocitos B a través de CD40 es insuficiente para romper la tolerancia inmunológica. Existen mecanismos en médula ósea y en periferia que eliminan a los linfocitos B activados antes de su diferenciación a célula plasmática.

4.- La expresión de CD5 en linfocitos B no correlaciona con su origen ontogénico y por ende no es característico de una subpoblación en especial. Su expresión correlaciona con el estado de activación celular, probablemente actuando como un regulador negativo.

IX. Apéndice

Tabla I. Anticuerpos monoclonales* utilizados para citometría de flujo

Marcador	clona	Origen	Isotipo	conjugado	Dilución
B220/CD45R	RA3-6B2	Rata	IgG _{2a} , κ	FITC	1:200
				Cy5-PE	1:500
				PerCp	1:100
IgM	R6-60.2	Rata	IgG _{2a} , κ	FITC	1:100
CD43	S7	Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:300
CD24	30-F1	Rata	IgG _{2c} , κ	biotina	1:200
Ly51/BP-1	BP-1	Ratón	IgG _{2a} , κ	FITC	1:50
CD25	PC61	Rata	IgG ₁ , λ	PE	1:200
CD40	44986	Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:200
IgD ^a	AMS 9.1	Ratón	IgG2 _b ^b , κ	biotina	1:750
IgD ^b	217-170	Ratón	IgG ₁ ^a , κ	biotina	1:750
		Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:500
CD95/Fas	Jo2	Hamster armenio	IgG ₂ , λ	biotina	1:200
I-Ab	25-9-17	Ratón	IgG _{2a} , κ	FITC	1:200
CD23	B3B4	Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:200
CD5	53-7.3	Rata	IgG _{2a} , κ	PE, biotina	1:1000
CD90/Thy1.2	53-2.1	Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:500
CD4	GK1.5	Rata	IgG _{2b} , κ	biotina	1:1000
CD8a	53.67	Rata	IgG _{2a} , κ	PE	1:500
CD3e	145-2C11	Hamster armenio	IgG ₁ , κ	APC	1:500
CD117/c-kit	2B8	Rata	IgG _{2b} , κ	biotina	1:250
CD154	MR1	Hamster armenio	IgG ₃ , κ	biotina	1:100
CD11b/Mac-1	M1/70	Rata	IgG _{2b} , κ	FITC	1:250
Ly-6G/Gr-1	RB6-8C5	Rata	IgG _{2b} , κ	biotina	1:1000

*Todos fueron proporcionados por Pharmingen, San Diego, CA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla II. Análisis del compartimiento de linfocitos B esplénicos							
Edad	Exp#	Controles			Transgénicos		
		n	B220 ⁺ (x10 ⁶)	B220 ⁺ (%)	n	B220 ⁺ (x10 ⁶)	B220 ⁺ (%)
Neonatos	1	3	1.2±0.3	25.8±3.4	2	0.5±0.4	25.6±13.6
	2	1	0.9	33.4	3	3.4±1.1	55.7±6.0
	X ± D.E.	4	1.1±0.3	27.7±4.7	5	2.2±1.7	43.7±18.3
2 semanas	1	3	43.5±19.3	70.4±0.9	3	78.6±42.3	60.5±5.9
	2	2	10.3±1.8	59.9±1.6	2	23.6±1.2	28.6±0.1
	3	3	7.6±1.9	43.9±2.7	3	29.7±24.7	60.1±10.3
	X ± D.E.	8	19.1±19.2	55.8±12	8	46.5±37.3	52.4±16
4 semanas	1	2	34.2±10.4	67.2±0.9	1	5.8	29.4
	2	2	45.9±4.8	71.3±2.8	2	2.9±0.4	33.9±6.8
	3	3	34.9±17.5	63.8±2.1	3	15.9±2.9	27.5±9.2
	X ± D.E.	7	37.8±12.4	66.9±3.7	6	9.9±6.9	29.9±7.3
12 semanas	1	2	87±28.2	68.7±0.4	2	7.4±7.4	8.5±2.9
	2	2	84±13.4	63.6±1.6	2	0.7±0.4	2.3±0.2
	3	2	29.3±10.5	62.1±1.9	1	0.3	6.2
	4	2	31.6±8	58.6±1.6	3	0.2±0.1	3±1.4
	5	2	32.9±5.9	41.3±5.1	1	1.4	1
X ± D.E.	10	53±30.3	58.9±10	9	2±4	4.2±3	
32 semanas	1	2	35.8±1.4	57.8±3.9	2	0.01±0.006	5.4±4.5

Tabla II. Análisis cuantitativo del compartimiento de linfocitos B en el bazo de ratones transgénicos y controles de camada no transgénicos a diferentes edades. En cada experimento independiente (exp #), el número absoluto de células nucleadas se calculó en hemocitómetro a partir de esplenocitos en suspensión obtenida de homogenado total de bazo. La proporción de linfocitos B220⁺ se determinó por citometría de flujo. Los valores representan el promedio (X) ± desviación estándar (D.E.) de cada experimento independiente. X ± D.E representa el promedio y desviación estándar de todos los experimentos independientes a determinada edad, los cuales se encuentran representados en las figuras 16 y 17 A-C.

Tabla III. Análisis ontogénico de la linfopoyesis B en hígado neonatal y médula ósea.							
Edad	# Exp	Control			Tg		
		n	B220*(x10 ⁶)	%IgM (B220*)	n	B220*(x10 ⁶)	%IgM (B220*)
Neonato (hígado)	1	3	2.5±1	17.8±3	2	3±0.6	19.8±0.9
	2	1	1.6	31.875	3	7.2±4.8	45.3±2.8
	X ± D.E	4	2.3±0.9	21.3±7.4	5	5.5±4.1	35.1±14
2 semanas (M ósea)	1	3	4.3±0.8	26.7±3.4	3	0.9±0.2	45.6±7.5
	2	3	1.2±0.2	18.8±3	2	0.5±0.01	45.1±17
	X ± D.E	6	3±1.8	23.6±5.2	6	0.7±0.3	45.4±10
4 semanas (M ósea)	1	2	1.2±0.9	32±3.3	1	4.1	7.4
	2	2	3.6±0.5	22±4.6	2	0.18±0.15	7.7±1.5
	3	3	3.8±1.6	33.8±28.6	3	0.1±0.1	29.2±9.3
	X ± D.E	7	3±1.6	29.9±17.5	6	0.15±0.11	18.4±13.2
10-12 semanas (M ósea)	1	2	3.4±0.09	37.7±2	2	0.5±0.1	20.2±14
	2	2	2.1±0.6	29.4±0.7	2	0.05±0.01	18.7±0.8
	3	2	1±0.2	44.6±5.8	1	0.01	18.7
	4	2	1.4±0.02	27.6±0.5	3	0.2±0.07	5.5±0.9
	5	2	2.2±1.1	36.8±3.5	1	0.1	9
	X ± D.E	10	2±0.9	35.2±6.9	9	0.2±0.1	13.6±8.5
32 semanas (M ósea)	1	2	0.5±0.1	54.3±4.5	2	0.19±0.2	14.7±4.1

Tabla III. Análisis cuantitativo por edad de la linfopoyesis B en hígado neonatal y médula ósea de ratones transgénicos y controles de camada no transgénicos. En cada experimento independiente (exp #), el número absoluto de células nucleadas se calculó en hemocitometro a partir de células en suspensión obtenida de homogenado total de hígado, o bien de células de 2 fémures/2. La proporción de linfocitos B220⁺ se determinó por citometría de flujo con respecto al total de células nucleadas definidas por FSC y SSC. El porcentaje de células IgM⁺ se determinó con respecto al total de linfocitos B220⁺. Los valores representan el promedio ± desviación estándar de cada experimento independiente. X ± D.E. representa el promedio y desviación estándar de todos los experimentos independientes a determinada edad, los cuales se encuentran representados en las **figuras 18 A-C y 19 B-D.**

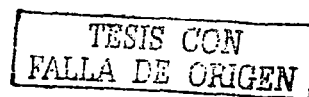
Tabla IV. Niveles de inmunoglobulina sérica en ratones transgénicos y controles de camada							
Isotipo	Genotipo	2 semanas		4 semanas		12 semanas	
		(1/título)/100	n	(1/título)/100	n	(1/título)/100	n
IgM	C	44±4	3	275±245	4	415±79	4
	Tg	66±8	2	136±88	3	88±40	8
IgG ₁	C	ND	ND	249±156	4	889±116	4
	Tg	ND	ND	73±32	3	90±62	8
IgG _{2a}	C	10±0.1	3	97±57	4	765±55	4
	Tg	5±2	2	31±13	3	23±10	8
IgG _{2b}	C	1271±82	3	422±223	4	2629±355	4
	Tg	952±85	2	164±61	3	28±8	8
IgG ₃	C	ND	ND	562±342	4	889±102	4
	Tg	ND	ND	321±238	3	90±62	8
IgA	C	4±0.4	3	44±20	4	553±66	4
	Tg	4±0.1	2	23±15	3	13±4	8

Tabla IV. Determinación de Ig's séricas en ratones TgCD154 y controles de camada a las 2, 4 y 12 semanas de edad. Se muestra el promedio ± desviación estándar de las diluciones necesarias para obtener una D.O. = 0.05 X 100. n, número de ratones analizados. ND, no determinado.

IX. Bibliografía.

- 1.- Burnet, F.M. The clonal selection theory of aquired immunity. Vanderbilt University Press. Nashville, Tennessee. 1959
- 2.- P. Bretscher and M. Cohn. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169 (950):1042-1049, 1970.
- 3.- K. J. Lafferty and A. J. Cunningham. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.* 53 (1):27-42, 1975.
- 4.- M. K. Jenkins and R. H. Schwartz. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 165 (2):302-319, 1987.
- 5.- R. Medzhitov and C. A. Janeway, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296 (5566):298-300, 2002.
- 6.- R. Schwartz. Immunological tolerance. In *Fundamental Immunology*, 4th edition. De. William Paul. Lippincott-Raven. 1999
- 7.- K. Rajewsky. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381 (6585):751-758, 1996.
- 8.- S. J. Morrison, D. E. Wright, S. H. Cheshier, and I. L. Weissman. Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr.Opin.Immunol.* 9 (2):216-221, 1997.
- 9.- S. J. Morrison and I. L. Weissman. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1 (8):661-673, 1994.
- 10.- A. Wiesmann, R. L. Phillips, M. Mojica, L. J. Pierce, A. E. Searles, G. J. Spangrude, and I. Lemischka. Expression of CD27 on murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunity* 12 (2):193-199, 2000.
- 11.- A.G Rolink, And F. Melchers. B-lymphocyte development and biology. In *Fundamental Immunology*, 4th edition. De. William Paul. Lippincott-Raven. 1999
- 12.- M. Kondo, I. L. Weissman, and K. Akashi. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91 (5):661-672, 1997.
- 13.- B. L. Kee and C. Murre. Transcription factor regulation of B lineage commitment. *Curr.Opin.Immunol.* 13 (2):180-185, 2001.
- 14.- E. W. Scott, M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265 (5178):1573-1577, 1994.
- 15.- E. W. Scott, R. C. Fisher, M. C. Olson, E. W. Kehrli, M. C. Simon, and H. Singh. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* 6 (4):437-447, 1997.
- 16.- J. H. Wang, A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5 (6):537-549, 1996.
- 17.- K. Georgopoulos, M. Bigby, J. H. Wang, A. Molnar, P. Wu, S. Winandy, and A. Sharpe. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79 (1):143-156, 1994.

- 18.- G. Bain, E. C. Maandag, D. J. Izon, D. Amsen, A. M. Kruisbeek, B. C. Weintraub, I. Krop, M. S. Schlissel, A. J. Feeney, M. van Rooon, and . E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79 (5):885-892, 1994.
- 19.- G. Bain, E. C. Robanus Maandag, H. P. te Riele, A. J. Feeney, A. Sheehy, M. Schlissel, S. A. Shinton, R. R. Hardy, and C. Murre. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 6 (2):145-154, 1997.
- 20.- H. Lin and R. Grosschedl. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376 (6537):263-267, 1995.
- 21.- P. Urbanek, Z. Q. Wang, I. Fetka, E. F. Wagner, and M. Busslinger. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79 (5):901-912, 1994.
- 22.- Z. Kozmik, S. Wang, P. Dorfler, B. Adams, and M. Busslinger. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol. Cell Biol.* 12 (6):2662-2672, 1992.
- 23.- S. L. Nutt, A. M. Morrison, P. Dorfler, A. Rolink, and M. Busslinger. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by. *EMBO J.* 17 (8):2319-2333, 1998.
- 24.- S. L. Nutt, B. Heavey, A. G. Rolink, and M. Busslinger. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401 (6753):556-562, 1999.
- 25.- M. Horcher, A. Souabni, and M. Busslinger. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14 (6):779-790, 2001.
- 26.- M. Y. Chiang and J. G. Monroe. Role for transcription Pax5A factor in maintaining commitment to the B cell lineage by selective inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression. *J. Immunol.* 166 (10):6091-6098, 2001.
- 27.- A. Henderson and K. Calame. Transcriptional regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 16:163-200, 1998.
- 28.- Y. S. Li, R. Wasserman, K. Hayakawa, and R. R. Hardy. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5 (6):527-535, 1996.
- 29.- A. Rolink, E. ten Boekel, F. Melchers, D. T. Fearon, I. Krop, and J. Andersson. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* 183 (1):187-194, 1996.
- 30.- K. S. Tudor, K. J. Payne, Y. Yamashita, and P. W. Kincade. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 12 (3):335-345, 2000.
- 31.- R. R. Hardy, C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and K. Hayakawa. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173 (5):1213-1225, 1991.
- 32.- A. Rolink, E. ten Boekel, F. Melchers, D. T. Fearon, I. Krop, and J. Andersson. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* 183 (1):187-194, 1996.
- 33.- A. E. Namen, S. Lupton, K. Hjerrild, J. Wignall, D. Y. Mochizuki, A. Schmierer, B. Mosley, C. J. March, D. Urdal, and S. Gillis. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333 (6173):571-573, 1988.

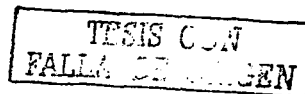


- 34.- T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, and T. Kishimoto. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCL chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382 (6592):635-638, 1996.
- 35.- D. Toksoz, K. M. Zsebo, K. A. Smith, S. Hu, D. Brankow, S. V. Suggs, F. H. Martin, and D. A. Williams. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (16):7350-7354, 1992.
- 36.- U. Freedden-Jeffry, P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med.* 181 (4):1519-1526, 1995.
- 37.- J. J. Peschon, P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, and . Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J.Exp.Med.* 180 (5):1955-1960, 1994.
- 38.- Q. Ma, D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (16):9448-9453, 1998.
- 39.- K. M. Zsebo, D. A. Williams, E. N. Geissler, V. C. Broudy, F. H. Martin, H. L. Atkins, R. Y. Hsu, N. C. Birkett, K. H. Okino, D. C. Murdock, and . Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63 (1):213-224, 1990.
- 40.- E. N. Geissler, M. A. Ryan, and D. E. Housman. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55 (1):185-192, 1988.
- 41.- P. Mombaerts, J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68 (5):869-877, 1992.
- 42.- Y. Shinkai, G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and . RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68 (5):855-867, 1992.
- 43.- S. Gong and M. C. Nussenzweig. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 272 (5260):411-414, 1996.
- 44.- A. M. Cheng, B. Rowley, W. Pao, A. Hayday, J. B. Bolen, and T. Pawson. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378 (6554):303-306, 1995.
- 45.- M. Turner, P. J. Mee, P. S. Costello, O. Williams, A. A. Price, L. P. Duddy, M. T. Furlong, R. L. Geahlen, and V. L. Tybulewicz. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378 (6554):298-302, 1995.
- 46.- D. Kitamura, A. Kudo, S. Schaal, W. Muller, F. Melchers, and K. Rajewsky. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* 69 (5):823-831, 1992.
- 47.- Y. S. Li, K. Hayakawa, and R. R. Hardy. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J.Exp.Med.* 178 (3):951-960, 1993.
- 48.- A. G. Rolink, C. Schaniel, J. Andersson, and F. Melchers. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 13 (2):202-207, 2001.
- 49.- D. Kitamura, J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350 (6317):423-426, 1991.

- 50.- S. Pillai. The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes. *Immunity*. 10 (5):493-502, 1999.
- 51.- A. G. Rolink, T. Winkler, F. Melchers, and J. Andersson. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J.Exp.Med.* 191 (1):23-32, 2000.
- 52.- P. J. Fink and M. J. Bevan. Positive selection of thymocytes. *Adv.Immunol.* 59:99-133, 1995.
- 53.- C. Tanchot, F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276 (5321):2057-2062, 1997.
- 54.- D. Loffert, A. Ehlich, W. Muller, and K. Rajewsky. Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 4 (2):133-144, 1996.
- 55.- C. Mundt, S. Licence, T. Shimizu, F. Melchers, and I. L. Martensson. Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J.Exp.Med.* 193 (4):435-445, 2001.
- 56.- F. E. Cronin, M. Jiang, A. K. Abbas, and S. A. Grupp. Role of mu heavy chain in B cell development. I. Blocked B cell maturation but complete allelic exclusion in the absence of Ig alpha/beta. *J.Immunol.* 161 (1):252-259, 1998.
- 57.- H. Cedar and Y. Bergman. Developmental regulation of immune system gene rearrangement. *Curr.Opin.Immunol.* 11 (1):64-69, 1999.
- 58.- N. Motoyama, F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii, and . Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x- deficient mice. *Science* 267 (5203):1506-1510, 1995.
- 59.- W. Fang, D. L. Mueller, C. A. Pennell, J. J. Rivard, Y. S. Li, R. R. Hardy, M. S. Schlissel, and T. W. Behrens. Frequent aberrant immunoglobulin gene rearrangements in pro-B cells revealed by a bcl-xL transgene. *Immunity*. 4 (3):291-299, 1996.
- 60.- E. ten Boekel, F. Melchers, and A. Rolink. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int.Immunol.* 7 (6):1013-1019, 1995.
- 61.- D. M. Willerford, W. Swat, and F. W. Alt. Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6 (5):603-609, 1996.
- 62.- J. R. Gorman and F. W. Alt. Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv.Immunol.* 69:113-181, 1998.
- 63.- A. G. Rolink, J. Andersson, and F. Melchers. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur.J.Immunol.* 28 (11):3738-3748, 1998.
- 64.- N. R. Klinman. The "clonal selection hypothesis" and current concepts of B cell tolerance. *Immunity*. 5 (3):189-195, 1996.
- 65.- D. M. Allman, S. E. Ferguson, and M. P. Cancro. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen^{hi} and exhibit unique signaling characteristics. *J.Immunol.* 149 (8):2533-2540, 1992.

- 66.- D. M. Allman, S. E. Ferguson, V. M. Lentz, and M. P. Cancro. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J.Immunol.* 151 (9):4431-4444, 1993.
- 67.- F. Loder, B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M. C. Lamers, and R. Carsetti. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J.Exp.Med.* 190 (1):75-89, 1999.
- 68.- E. P. Bowman, J. J. Campbell, D. Soler, Z. Dong, N. Manlongat, D. Picarella, R. R. Hardy, and E. C. Butcher. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J.Exp.Med.* 191 (8):1303-1318, 2000.
- 69.- F. Martin and J. F. Kearney. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr.Opin.Immunol.* 13 (2):195-201, 2001.
- 70.- T. Kurosaki. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 17:555-592, 1999.
- 71.- Campbell, K.S. Signal transduction from the B cell antigen receptor. *Curr Op Immunol.* 11:256-264, 1999.
- 72.- D. A. Fruman, A. B. Satterthwaite, and O. N. Witte. Xid-like phenotypes: a B cell signalosome takes shape. *Immunity* 13 (1):1-3, 2000.
- 73.- A.L. DeFranco. B-Lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology* 4th edition. Ed. William Paul. Lippincott-Raven. 1999
- 74.- T. Kurosaki and S. Tsukada. BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* 12 (1):1-5, 2000.
- 75.- M. E. Kelly and A. C. Chan. Regulation of B cell function by linker proteins. *Curr.Opin.Immunol.* 12 (3):267-275, 2000.
- 76.- T. Kurosaki. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr.Opin.Immunol.* 12 (3):276-281, 2000.
- 77.- T. F. Tedder, M. Inaoki, and S. Sato. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6 (2):107-118, 1997.
- 78.- T. Tsubata. Co-receptors on B lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 11 (3):249-255, 1999.
- 79.- M. Fujimoto, Y. Fujimoto, J. C. Poe, P. J. Jansen, C. A. Lowell, A. L. DeFranco, and T. F. Tedder. CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity* 13 (1):47-57, 2000.
- 80.- J. G. Cyster and C. C. Goodnow. Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. *Immunity.* 6 (5):509-517, 1997.
- 81.- G. Kelsoe. In situ studies of the germinal center reaction. *Adv.Immunol.* 60:267-288, 1995.
- 82.- G Kelsoe. Life and death in germinal centers (Redux). *Immunity* 4:107-111, 1996.
- 83.- K. Reif, E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster, and J. G. Cyster. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416 (6876):94-99, 2002.
- 84.- P. Garside, E. Ingulli, R. R. Merica, J. G. Johnson, R. J. Noelle, and M. K. Jenkins. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 281 (5373):96-99, 1998.

85. H. Martinez-Valdez, C. Guret, O. de Bouteiller, I. Fugier, J. Banchereau, and Y. J. Liu. Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J.Exp.Med.* 183 (3):971-977, 1996.
- 86.- Y. J. Liu, O. de Bouteiller, and I. Fugier-Vivier. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr.Opin.Immunol.* 9 (2):256-262, 1997.
- 87.- T. D. Randall, A. W. Heath, L. Santos-Argumedo, M. C. Howard, I. L. Weissman, and F. E. Lund. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8 (6):733-742, 1998.
- 88.- F. G. Kroese, E. C. Butcher, A. M. Stall, P. A. Lalor, S. Adams, and L. A. Herzenberg. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int.Immunol.* 1 (1):75-84, 1989.
- 89.- K. L. Calame. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat.Immunol.* 2 (12):1103-1108, 2001.
- 90.- A. J. Macpherson, D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288 (5474):2222-2226, 2000.
- 91.- K. Hayakawa and R. R. Hardy. Development and function of B-1 cells. *Curr.Opin.Immunol.* 12 (3):346-353, 2000.
- 92.- G. D. Yancopoulos, S. V. Desiderio, M. Paskind, J. F. Kearney, D. Baltimore, and F. W. Alt. Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* 311 (5988):727-733, 1984.
- 93.- F. W. Alt, T. K. Blackwell, and G. D. Yancopoulos. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238 (4830):1079-1087, 1987.
- 94.- B. A. Malynn, G. D. Yancopoulos, J. E. Barth, C. A. Bona, and F. W. Alt. Biased expression of JH-proximal VH genes occurs in the newly generated repertoire of neonatal and adult mice. *J.Exp.Med.* 171 (3):843-859, 1990.
- 95.- A. J. Marshall, G. E. Wu, and G. J. Paige. Frequency of VH81x usage during B cell development: initial decline in usage is independent of Ig heavy chain cell surface expression. *J.Immunol.* 156 (6):2077-2084, 1996.
- 96.- ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity* 7:357-368, 1997.
- 97.- C. L. Benedict and J. F. Kearney. Increased junctional diversity in fetal B cells results in a loss of protective anti-phosphorylcholine antibodies in adult mice. *Immunity* 10 (5):607-617, 1999.
- 98.- F. Martin and J. F. Kearney. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12 (1):39-49, 2000.
- 99.- C. A. Pennell, T. J. Mercolino, T. A. Grdina, L. W. Arnold, G. Haughton, and S. H. Clarke. Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection. *Eur.J.Immunol.* 19 (7):1289-1295, 1989.
- 100.- R. R. Hardy and K. Hayakawa. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv.Immunol.* 55:297-339, 1994.
- 101.- K. Hayakawa, M. Asano, S. A. Shinton, M. Gui, D. Allman, C. L. Stewart, J. Silver, and R. R. Hardy. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285 (5424):113-116, 1999.



- 102.- C. Pan, N. Baumgarth, and J. R. Parnes. CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. *Immunity* 11 (4):495-506, 1999.
- 103.- T. Adachi, C. Wakabayashi, T. Nakayama, H. Yakura, and T. Tsubata. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J.Immunol.* 164 (3):1223-1229, 2000.
- 104.- A. Cariappa, M. Tang, C. Parng, E. Nebelitskiy, M. Carroll, K. Georgopoulos, and S. Pillai. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14 (5):603-615, 2001.
- 105.- K. P. Lam, R. Kuhn, and K. Rajewsky. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90 (6):1073-1083, 1997.
- 106.- R. M. Zinkernagel, S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. Antigen localisation regulates immune responses in a. *Immunol.Rev.* 156:199-209, 1997.
- 107.- D. A. Nemazee and K. Burki. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337 (6207):562-566, 1989.
- 108.- S. B. Hartley, J. Crosbie, R. Brink, A. B. Kantor, A. Basten, and C. C. Goodnow. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353 (6346):765-769, 1991.
- 109.- C. Chen, Z. Nagy, M. Z. Radic, R. R. Hardy, D. Huszar, S. A. Camper, and M. Weigert. The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* 373 (6511):252-255, 1995.
- 110.- J. G. Cyster and C. C. Goodnow. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* 3 (6):691-701, 1995.
- 111.- C. C. Goodnow. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (6):2264-2271, 1996.
- 112.- J. C. Rathmell, M. P. Cooke, W. Y. Ho, J. Grein, S. E. Townsend, M. M. Davis, and C. C. Goodnow. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376 (6536):181-184, 1995.
- 113.- J. C. Rathmell, S. E. Townsend, J. C. Xu, R. A. Flavell, and C. C. Goodnow. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for. *Cell* 87 (2):319-329, 1996.
- 114.- B. Pulendran, G. Kannourakis, S. Nouri, K. G. Smith, and G. J. Nossal. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 375 (6529):331-334, 1995.
- 115.- K. M. Shokat and C. C. Goodnow. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 375 (6529):334-338, 1995.
- 116.- M. van Eijk, T. Defrance, A. Hennino, and C. de Groot. Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. *Trends Immunol.* 22 (12):677-682, 2001.
- 117.- C. C. Goodnow, J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael, and . Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334 (6184):676-682, 1988.
- 118.- C. C. Goodnow, J. Crosbie, H. Jorgensen, R. A. Brink, and A. Basten. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 342 (6248):385-391, 1989.



- 119.- J. Erikson, M. Z. Radic, S. A. Camper, R. R. Hardy, C. Carmack, and M. Weigert. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* 349 (6307):331-334, 1991.
- 120.- M. P. Cooke, A. W. Heath, K. M. Shokat, Y. Zeng, F. D. Finkelman, P. S. Linsley, M. Howard, and C. C. Goodnow. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells. *J.Exp.Med.* 179 (2):425-438, 1994.
- 121.- D. A. Fulcher and A. Basten. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double- transgenic model. *J.Exp.Med.* 179 (1):125-134, 1994.
- 122.- S. C. Morris, M. Moroldo, E. H. Giannini, T. Orekhova, and F. D. Finkelman. In vivo survival of autoreactive B cells: characterization of long-lived B cells. *J Immunol.* 164: 3035-3046, 2000.
- 123.- S. W. Martin and C. C. Goodnow. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat.Immunol.* 3 (2):182-188, 2002.
- 124.- C. C. Goodnow, R. Brink, and E. Adams. Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* 352 (6335):532-536, 1991.
- 125.- J. M. Eris, A. Basten, R. Brink, K. Doherty, M. R. Kehry, and P. D. Hodgkin. Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (10):4392-4396, 1994.
- 126.- S. L. Tiegs, D. M. Russell, and D. Nemazee. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J.Exp.Med.* 177 (4):1009-1020, 1993.
- 127.- M. Z. Radic, J. Erikson, S. Litwin, and M. Weigert. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J.Exp.Med.* 177 (4):1165-1173, 1993.
- 128.- D. Gay, T. Saunders, S. Camper, and M. Weigert. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J.Exp.Med.* 177 (4):999-1008, 1993.
- 129.- D. Melamed, R. J. Benschop, J. C. Cambier, and D. Nemazee. Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell* 92 (2):173-182, 1998.
- 130.- P. C. Sandel and J. G. Monroe. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10 (3):289-299, 1999.
- 131.- M. W. Retter and D. Nemazee. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J.Exp.Med.* 188 (7):1231-1238, 1998.
- 132.- R. Casellas, T. A. Shih, M. Kleinewietfeld, J. Rakonjac, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M. C. Nussenzweig. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291 (5508):1541-1544, 2001.
- 133.- S. Han, B. Zheng, D. G. Schatz, E. Spanopoulou, and G. Kelsoe. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 274 (5295):2094-2097, 1996.
- 134.- M. Hikida, M. Mori, T. Takai, K. Tomochika, K. Hamatani, and H. Ohmori. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science* 274 (5295):2092-2094, 1996.
- 135.- S. Han, S. R. Dillon, B. Zheng, M. Shimoda, M. S. Schlüssel, and G. Kelsoe. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 278 (5336):301-305, 1997.

- 136.- F. Papavasiliou, R. Casellas, H. Suh, X. F. Qin, E. Besmer, R. Pelanda, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M. C. Nussenzweig. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 278 (5336):298-301, 1997.
- 137.- W. Yu, H. Nagaoka, M. Jankovic, Z. Misulovin, H. Suh, A. Rolink, F. Melchers, E. Meffre, and M. C. Nussenzweig. Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* 400 (6745):682-687, 1999.
- 138.- R. J. Monroe, K. J. Seidl, F. Gaertner, S. Han, F. Chen, J. Sekiguchi, J. Wang, R. Ferrini, L. Davidson, G. Kelsoe, and F. W. Alt. RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 11 (2):201-212, 1999.
- 139.- S. E. Townsend, B. C. Weintraub, and C. C. Goodnow. Growing up on the streets: why B-cell development differs from T-cell development. *Immunol. Today* 20 (5):217-220, 1999.
- 140.- J. Banchereau, F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. The CD40 antigen and its ligand. *Annu.Rev.Immunol.* 12:881-922, 1994.
- 141.- L. B. Clark, T. M. Foy, and R. J. Noelle. CD40 and its ligand. *Adv.Immunol.* 63:43-78, 1996.
- 142.- R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (4):487-501, 2001.
- 143.- C. van Kooten and J. Banchereau. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr.Opin.Immunol.* 9 (3):330-337, 1997.
- 144.- G. A. Bishop and B. S. Hostager. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 13 (3):278-285, 2001.
- 145.- C. R. Maliszewski, K. Grabstein, W. C. Fanslow, R. Armitage, M. K. Spriggs, and T. A. Sato. Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur.J.Immunol.* 23 (5):1044-1049, 1993.
- 146.- R. J. Armitage, B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and W. C. Fanslow. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J.Immunol.* 150 (9):3671-3680, 1993.
- 147.- E. A. Ranheim and T. J. Kipps. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J.Exp.Med.* 177 (4):925-935, 1993.
- 148.- F. Malisan, F. Briere, J. M. Bridon, N. Harindranath, F. C. Mills, E. E. Max, J. Banchereau, and H. Martinez-Valdez. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 183 (3):937-947, 1996.
- 149.- H. H. Jabara, S. M. Fu, R. S. Geha, and D. Vercelli. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J.Exp.Med.* 172 (6):1861-1864, 1990.
- 150.- H. Gascan, J. F. Gauchat, G. Aversa, P. Van Vlasselaer, and J. E. de Vries. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J.Immunol.* 147 (1):8-13, 1991.
- 151.- K. Nakanishi, K. Matsui, S. Kashiwamura, Y. Nishioka, J. Nomura, Y. Nishimura, N. Sakaguchi, S. Yonehara, K. Higashino, and S. Shinka. IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *Int.Immunol.* 8 (5):791-798, 1996.

- 152.- S. Fujieda, K. Zhang, and A. Saxon. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass- specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. *J.Immunol.* 155 (5):2318-2328, 1995.
- 153.- T. Tsubata, J. Wu, and T. Honjo. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 364 (6438):645-648, 1993.
- 154.- M. S. Choi, L. H. Boise, A. R. Gottschalk, J. Quintans, C. B. Thompson, and G. G. Klaus. The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur.J.Immunol.* 25 (5):1352-1357, 1995.
- 155.- P. Garrone, E. M. Neidhardt, E. Garcia, L. Galibert, C. van Kooten, and J. Banchereau. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 182 (5):1265-1273, 1995.
- 156.- E. J. Schattner, K. B. Elkon, D. H. Yoo, J. Tumang, P. H. Krammer, M. K. Crow, and S. M. Friedman. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J.Exp.Med.* 182 (5):1557-1565, 1995.
- 157.- T. Kawabe, T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1 (3):167-178, 1994.
- 158.- E. Castigli, F. W. Alt, L. Davidson, A. Bottaro, E. Mizoguchi, A. K. Bhan, and R. S. Geha. CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2- deficient blastocyst complementation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (25):12135-12139, 1994.
- 159.- J. Xu, T. M. Foy, J. D. Laman, E. A. Elliott, J. J. Dunn, T. J. Waldschmidt, J. Elsemore, R. J. Noelle, and R. A. Flavell. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1 (5):423-431, 1994.
- 160.- B. R. Renshaw, W. C. Fanslow, III, R. J. Armitage, K. A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B. L. Davison, and C. R. Maliszewski. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J.Exp.Med.* 180 (5):1889-1900, 1994.
- 161.- R. C. Allen, R. J. Armitage, M. E. Conley, H. Rosenblatt, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. A. Bedell, S. Edelhoff, C. M. Disteche, D. K. Simoneaux, and . CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259 (5097):990-993, 1993.
- 162.- J. P. DiSanto, J. Y. Bonnefoy, J. F. Gauchat, A. Fischer, and Basile G. de Saint. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 (6412):541-543, 1993.
- 163.- A. Aruffo, M. Farrington, D. Hollenbaugh, X. Li, A. Milatovich, S. Nonoyama, J. Bajorath, L. S. Grosmaire, R. Stenkamp, M. Neubauer, and . The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72 (2):291-300, 1993.
- 164.- U. Korthauer, D. Graf, H. W. Mages, F. Briere, M. Padayachee, S. Malcolm, A. G. Ugazio, L. D. Notarangelo, R. J. Levinsky, and R. A. Kroczeck. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 (6412):539-541, 1993.
- 165.- S. Lacroix-Desmazes, I. Resnick, D. Stahl, L. Mouthon, T. Espanol, J. Levy, S. V. Kaveri, L. Notarangelo, M. Eibl, A. Fischer, H. Ochs, and M. D. Kazatchkine. Defective self-reactive antibody repertoire of serum IgM in patients with hyper-IgM syndrome. *J.Immunol.* 162 (9):5601-5608, 1999.
- 166.- A. W. Larson and T. W. LeBien. Cross-linking CD40 on human B cell precursors inhibits or enhances growth depending on the stage of development and the IL costimulus. *J.Immunol.* 153 (2):584-594, 1994.

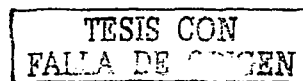
- 167.- E. Castigli, F. Young, A. M. Carossino, F. W. Alt, and R. S. Geha. CD40 expression and function in murine B cell ontogeny. *Int.Immunol.* 8 (3):405-411, 1996.
- 168.- R. E. Callard, R. J. Armitage, W. C. Fanslow, and M. K. Spriggs. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol.Today* 14 (11):559-564, 1993.
- 169.- F. Facchetti, C. Appiani, L. Salvi, J. Levy, and L. D. Notarangelo. Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells. *J.Immunol.* 154 (12):6624-6633, 1995.
- 170.- I. S. Grewal, J. Xu, and R. A. Flavell. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 378 (6557):617-620, 1995.
- 171.- I.S. Grewal, R.A Flavell. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol Today* 17:410-414, 1996.
- 172.- C. Caux, C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J.Exp.Med.* 180 (4):1263-1272, 1994.
- 173.- M. Cella, D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* 184 (2):747-752, 1996.
- 174.- E. Stuber, W. Strober, and M. Neurath. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin-12 secretion. *J.Exp.Med.* 183 (2):693-698, 1996.
- 175.- V. Shreedhar, A. M. Moodycliffe, S. E. Ullrich, C. Bucana, M. L. Kripke, and L. Flores-Romo. Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity* 11 (5):625-636, 1999.
- 176.- R. D. Stout and J. Suttles. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol.Today* 17 (10):487-492, 1996.
- 177.- K. A. Campbell, P. J. Owendale, M. K. Kennedy, W. C. Fanslow, S. G. Reed, and C. R. Maliszewski. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 4 (3):283-289, 1996.
- 178.- M. Kamanaka, P. Yu, T. Yasui, K. Yoshida, T. Kawabe, T. Horii, T. Kishimoto, and H. Kikutani. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 4 (3):275-281, 1996.
- 179.- I. S. Grewal, H. G. Foellmer, K. D. Grewal, J. Xu, F. Hardardottir, J. L. Baron, C. A. Janeway, Jr., and R. A. Flavell. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 273 (5283):1864-1867, 1996.
- 180.- J. Tan, T. Town, D. Paris, T. Mori, Z. Suo, F. Crawford, M. P. Mattson, R. A. Flavell, and M. Mullan. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta- amyloid stimulation. *Science* 286 (5448):2352-2355, 1999.
- 181.- B. Becher, B. G. Durell, A. V. Miga, W. F. Hickey, and R. J. Noelle. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J.Exp.Med.* 193 (8):967-974, 2001.
- 182.- A. H. Galy and H. Spits. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J.Immunol.* 149 (3):775-782, 1992.

- 183.- T. M. Foy, D. M. Page, T. J. Waldschmidt, A. Schoneveld, J. D. Laman, S. R. Masters, L. Tygrett, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, E. Claassen, J.C. Xu, R.A. Flavell, S. Oehen, S.M. Hedrick and R.J. Noelle. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J.Exp.Med.* 182 (5):1377-1388, 1995.
- 184.- A. A. Gaspari, G. D. Sempowski, P. Chess, J. Gish, and R. P. Phipps. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur.J.Immunol.* 26 (6):1371-1377, 1996.
- 185.- J. Peguet-Navarro, C. Dalbiez-Gauthier, C. Moulon, O. Berthier, A. Reano, M. Gaucherand, J. Banchereau, F. Rousset, and D. Schmitt. CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J.Immunol.* 158 (1):144-152, 1997.
- 186.- K. Karmann, C. C. Hughes, J. Schechner, W. C. Fanslow, and J. S. Pober. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (10):4342-4346, 1995.
- 187.- I. Berberich, G. L. Shu, and E. A. Clark. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J.Immunol.* 153 (10):4357-4366, 1994.
- 188.- I. Berberich, G. Shu, F. Siebelt, J. R. Woodgett, J. M. Kyriakis, and E. A. Clark. Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J.* 15 (1):92-101, 1996.
- 189.- C. L. Sutherland, A. W. Heath, S. L. Pelech, P. R. Young, and M. R. Gold. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J.Immunol.* 157 (8):3381-3390, 1996.
- 190.- A. Craxton, G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs, and E. A. Clark. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J.Immunol.* 161 (7):3225-3236, 1998.
- 191.- C. L. Ren, T. Morio, S. M. Fu, and R. S. Geha. Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2. *J.Exp.Med.* 179 (2):673-680, 1994.
- 192.- H. D adgostar, B. Zarnegar, A. Hoffmann, X. F. Qin, U. Truong, G. Rao, D. Baltimore, and G. Cheng. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (3):1497-1502, 2002.
- 193.- M. R. Kuhne, M. Robbins, J. E. Hambor, M. F. Mackey, Y. Kosaka, T. Nishimura, J. P. Giggley, R. J. Noelle, and D. M. Calderhead. Assembly and regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *J.Exp.Med.* 186 (2):337-342, 1997.
- 194.- L. T. Nguyen, G. S. Duncan, C. Mirtsos, M. Ng, D. E. Speiser, A. Shahinian, M. W. Marino, T. W. Mak, P. S. Ohashi, and W. C. Yeh. TRAF2 deficiency results in hyperactivity of certain TNFR1 signals and impairment of CD40-mediated responses. *Immunity* 11 (3):379-389, 1999.
- 195.- B. S. Hostager and G. A. Bishop. Cutting edge: contrasting roles of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *J.Immunol.* 162 (11):6307-6311, 1999.
- 196.- E. Leo, J. M. Zapata, and J. C. Reed. CD40-mediated activation of Ig-Cga. *Eur.J.Immunol.* 29 (12):3908-3913, 1999.
- 197.- S. V. Jalukar, B. S. Hostager, and G. A. Bishop. Characterization of the roles of TNF receptor-associated factor 6 in CD40-mediated B lymphocyte effector functions. *J.Immunol.* 164 (2):623-630, 2000.

- 198.- F. K. Chan, H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288 (5475):2351-2354, 2000.
- 199.- M. Rothe, V. Sarma, V. M. Dixit, and D. V. Goeddel. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269 (5229):1424-1427, 1995.
- 200.- Y. Xu, G. Cheng, and D. Baltimore. Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity* 5 (5):407-415, 1996.
- 201.- J. E. Matsuura, A. E. Morris, R. R. Ketchum, E. H. Braswell, R. Klinke, W. R. Gombotz, and R. L. Remmele, Jr. Biophysical characterization of a soluble CD40 ligand (CD154) coiled-coil trimer: evidence of a reversible acid-denatured molten globule. *Arch.Biochem.Biophys.* 392 (2):208-218, 2001.
- 202.- P. Hermann, C. Van Kooten, C. Gaillard, J. Banchereau, and D. Blanchard. CD40 ligand-positive CD8+ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur.J.Immunol.* 25 (10):2972-2977, 1995.
- 203.- F. Mach, U. Schonbeck, G. K. Sukhova, T. Bourcier, J. Y. Bonnefoy, J. S. Pober, and P. Libby. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (5):1931-1936, 1997.
- 204.- A. A. Horner, H. Jabara, N. Ramesh, and R. S. Geha. gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 181 (3):1239-1244, 1995.
- 205.- F. M. Lobo, R. Zanjani, N. Ho, T. A. Chatila, and R. L. Fuleihan. Calcium-dependent activation of TNF family gene expression by Ca2+/calmodulin kinase type IV/G γ and calcineurin. *J.Immunol.* 162 (4):2057-2063, 1999.
- 206.- E. Parra, T. Mustelin, M. Dohlsten, and D. Mercola. Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter. *J.Immunol.* 166 (4):2437-2443, 2001.
- 207.- H. Lindgren, K. Axcrone, and T. Leanderson. Regulation of transcriptional activity of the murine CD40 ligand promoter in response to signals through TCR and the costimulatory molecules CD28 and CD2. *J.Immunol.* 166 (7):4578-4585, 2001.
- 208.- D. van Essen, H. Kikutani, and D. Gray. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 378 (6557):620-623, 1995.
- 209.- M. H. Blotta, J. D. Marshall, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J.Immunol.* 156 (9):3133-3140, 1996.
- 210.- T. Miyashita, M. J. McIlraith, A. C. Grammer, Y. Miura, J. F. Attrep, Y. Shimaoka, and P. E. Lipsky. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J.Immunol.* 158 (10):4620-4633, 1997.
- 211.- U. Koppenhoefer, B. Brenner, F. Lang, and E. Gulbins. The CD40-ligand stimulates T-lymphocytes via the neutral sphingomyelinase: a novel function of the CD40-ligand as signalling molecule. *FEBS Lett.* 414 (2):444-448, 1997.
- 212.- F. H. Durie, R. A. Fava, T. M. Foy, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 261 (5126):1328-1330, 1993.
- 213.- C. Mohan, Y. Shi, J. D. Laman, and S. K. Datta. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J.Immunol.* 154 (3):1470-1480, 1995.

- 214.- F. Mach, U. Schonbeck, G. K. Sukhova, E. Atkinson, and P. Libby. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394 (6689):200-203, 1998.
- 215.- C. P. Larsen and T. C. Pearson. The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 9 (5):641-647, 1997.
- 216.- A. Desai-Mehta, L. Lu, R. Ramsey-Goldman, and S. K. Datta. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J. Clin. Invest.* 97 (9):2063-2073, 1996.
- 217.- M. Koshy, D. Berger, and M. K. Crow. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 98 (3):826-837, 1996.
- 218.- M. J. Yellin, V. D'Agati, G. Parkinson, A. S. Han, A. Szema, D. Baum, D. Estes, M. Szabolcs, and L. Chess. Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides. *Arthritis Rheum.* 40 (1):124-134, 1997.
- 219.- S. Guerder, D. E. Picarella, P. S. Linsley, and R. A. Flavell. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (11):5138-5142, 1994.
- 220.- von Herrath M G, Guerder S, Lewicki H, Flavell R A, Oldstone M B A. Co-expression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic b cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes. *Immunity* 3:727-735, 1995.
- 221.- R. J. Armitage, W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski, and Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357 (6373):80-82, 1992.
- 222.- W.D. Warren, M.T. Berton. Induction of germ-line μ and ϵ Ig gene expression in murine B cells. *J Immunol.* 155:5637-5646, 1995.
- 223.- X. Wang, S. Zinkel, K. Polonsky, and E. Fuchs. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (1):219-226, 1997.
- 224.- C. H. Clegg, J. T. Rulffes, H. S. Haugen, I. H. Hoggatt, A. A. Ruffo, S. K. Durham, A. G. Farr, and D. Hollenbaugh. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int. Immunol.* 9 (8):1111-1122, 1997.
- 225.- M. P. Brown, D. J. Topham, M. Y. Sangster, J. Zhao, K. J. Flynn, S. L. Surman, D. L. Woodland, P. C. Doherty, A. G. Farr, P. K. Pattengale, and M. K. Brenner. Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. *Nat. Med.* 4 (11):1253-1260, 1998.
- 226.- R.A Miller. Aging and immune function. In *Fundamental Immunology*. 4th edition. De. William Paul. Lippincott-Raven, 1999
- 227.- Y. Z. Cong, E. Rabin, and H. H. Wortis. Treatment of murine CD5⁺ B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int. Immunol.* 3 (5):467-476, 1991.
- 228.- K. Lam, and K. Rajewsky. B cell antigen receptor and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* 190(4):471-477, 1999
- 229.- L.W. Arnold, C.A. Penell, S.K. McCray, and S.H. Clarke. Development of B-1 cells: Segregation of phosphatidyl choline-specific B cells to the B-1 population occurs after immunoglobulin gene expression. *J. Exp. Med.* 179: 1585-1595, 1994

- 230.- K.O. Cox, and S.J. Hardy. Autoantibodies against mouse bromelain-modified RBC are specifically inhibited by a common membrane phospholipid, phosphatidylcholine. *Immunology*. 55:263-269, 1985.
- 231.- R. D. Palmiter and R. L. Brinster. Germ-line transformation of mice. *Annu.Rev.Genet.* 20:465-499, 1986.
- 232.- T. Gridley. Insertional versus targeted mutagenesis in mice. *New Biol.* 3 (11):1025-1034, 1991.
- 233.- J. Storek, R. P. Witherspoon, D. Webb, and R. Storb. Lack of B cells precursors in marrow transplant recipients with chronic graft-versus-host disease. *Am.J.Hematol.* 52 (2):82-89, 1996.
- 234.- J. Storek, A. Joseph, G. Espino, M. A. Dawson, D. C. Douek, K. M. Sullivan, M. E. Flowers, P. Martin, G. Mathioudakis, R. A. Nash, R. Storb, F. R. Appelbaum, and D. G. Maloney. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 98 (13):3505-3512, 2001.
- 235.- M. B. Baker, R. L. Riley, E. R. Podack, and R. B. Levy. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (4):1366-1371, 1997.
- 236.- A. Shustov, I. Luzina, P. Nguyen, J. C. Papadimitriou, B. Handwerker, K. B. Elkon, and C. S. Via. Role of perforin in controlling B-cell hyperactivity and humoral autoimmunity. *J.Clin.Invest.* 106 (6):R39-R47, 2000.
- 237.- C. Benoist, and D. Mathis. T-Lymphocyte differentiation and biology. In *Fundamental Immunology*. 4th edition. De. William Paul. Lippincott-Raven. 1999.
- 238.- C. A. Mallick, E. C. Dudley, J. L. Vincy, M. J. Owen, and A. C. Hayday. Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 73 (3):513-519, 1993.
- 239.- S. Nagata. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365, 1997.
- 240.- D. Kagi, B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369 (6475):31-37, 1994.
- 241.- I. Forster, P. Vieira, and K. Rajewsky. Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int.Immunol.* 1 (4):321-331, 1989.
- 242.- I. Forster and K. Rajewsky. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (12):4781-4784, 1990.
- 243.- Z. Hao and K. Rajewsky. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J.Exp.Med.* 194 (8):1151-1164, 2001.
- 244.- Troy Randall y cols, comunicación personal.
- 245.- L. E. Daitch, M. W. Moore, D. M. Persiani, J. M. Durdik, and E. Selsing. Transcription and recombination of the murine RS element. *J.Immunol.* 149 (3):832-840, 1992.
- 246.- D. J. Martin and B. G. van Ness. Initiation and processing of two kappa immunoglobulin germ line transcripts in mouse B cells. *Mol.Cell Biol.* 10 (5):1950-1958, 1990.
- 247.- Y. Z. Cong, E. Rabin, and H. H. Wortis. Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int.Immunol.* 3 (5):467-476, 1991.



- 248.- H. H. Wortis, M. Teutsch, M. Higer, J. Zheng, and D. C. Parker. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (8):3348-3352, 1995.
- 249.- R. Berland and H. H. Wortis. An NFAT-dependent enhancer is necessary for anti-IgM-mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cells. *J.Immunol.* 161 (1):277-285, 1998.
- 250.- J. J. Perez-Villar, G. S. Whitney, M. A. Bowen, D. H. Hewgill, A. A. A ruffo, and S. B. Kanner. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol.Cell Biol.* 19 (4):2903-2912, 1999.
- 251.- G. Bikah, J. Carey, J. R. Ciallella, A. Tarakhovsky, and S. Bondada. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274 (5294):1906-1909, 1996.
- 252.- G. Sen, G. Bikah, C. Venkataraman, and S. Bondada. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur.J.Immunol.* 29 (10):3319-3328, 1999.
- 253.- H. S. Azzam, A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J.Exp.Med.* 188 (12):2301-2311, 1998.
- 254.- C. Pena-Rossi, L. A. Zuckerman, J. Strong, J. Kwan, W. Ferris, S. Chan, A. Tarakhovsky, A. D. Beyers, and N. Killeen. Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J.Immunol.* 163 (12):6494-6501, 1999.
- 255.- R. Li and D. M. Page. Requirement for a complex array of costimulators in the negative selection of autoreactive thymocytes in vivo. *J.Immunol.* 166 (10):6050-6056, 2001.
- 256.- J. D. Thomas, P. Sideras, C. I. Smith, I. Vorechovsky, V. Chapman, and W. E. Paul. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261 (5119):355-358, 1993.
- 257.- D. J. Rawlings, D. C. Saffran, S. Tsukada, D. A. Largaespada, J. C. Grimaldi, L. Cohen, R. N. Mohr, J. F. Bazan, M. Howard, N. G. Copeland, and . Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 261 (5119):358-361, 1993.
- 258.- J. D. Kerner, M. W. Appleby, R. N. Mohr, S. Chien, D. J. Rawlings, C. R. Maliszewski, O. N. Witte, and R. M. Perlmutter. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity* 3 (3):301-312, 1995.
- 259.- W. N. Khan, F. W. Alt, R. M. Gerstein, B. A. Malynn, I. Larsson, G. Rathbun, L. Davidson, S. Muller, A. B. Kantor, L. A. Herzenberg, and . Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3 (3):283-299, 1995.
- 260.- S. Hess and H. Engelmann. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J.Exp.Med.* 183 (1):159-167, 1996.
- 261.- T. D. Randall, A. W. Heath, L. Santos-Argumedo, M. C. Howard, I. L. Weissman, and F. E. Lund. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8 (6):733-742, 1998.
- 262.- T. Miyashita, M. J. McIlraith, A. C. Grammer, Y. Miura, J. F. Attrep, Y. Shimaoka, and P. E. Lipsky. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J.Immunol.* 158 (10):4620-4633, 1997.

- 263.- A. W. Heath, R. Chang, N. Harada, L. Santos-Argumedo, J. Gordon, C. Hannum, D. Campbell, A. B. Shanafelt, E. A. Clark, R. Torres, and . Antibodies to murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells. *Cell Immunol.* 152 (2):468-480, 1993.
- 264.- M. C. Bergman, J. F. Attrep, A. C. Grammer, and P. E. Lipsky. Ligation of CD40 influences the function of human Ig-secreting B cell hybridomas both positively and negatively. *J.Immunol.* 156 (9):3118-3132, 1996.
- 265.- T. Kouro, K. L. Medina, K. Oritani, and P. W. Kincade. Characteristics of early murine B-lymphocyte precursors and their direct sensitivity to negative regulators. *Blood* 97 (9):2708-2715, 2001.
- 266.- J. Tang, B. L. Nuccie, I. Ritterman, J. L. Liesveld, C. N. Abboud, and D. H. Ryan. TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *J.Immunol.* 159 (1):117-125, 1997.
- 267.- Calderón, R. y cols. Resultados no publicados.
- 268.- J. Wang, I. Taniuchi, Y. Maekawa, M. Howard, M. D. Cooper, and T. Watanabe. Expression and function of Fas antigen on activated murine B cells. *Eur.J.Immunol.* 26 (1):92-96, 1996.
- 269.- K. Masuda, J. Wang, and T. Watanabe. Reduced susceptibility to Fas-mediated apoptosis in B-1 cells. *Eur.J.Immunol.* 27 (2):449-455, 1997.
- 270.- J. G. Cyster and C. C. Goodnow. Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* 2 (1):13-24, 1995.
- 271.- K. L. Hippen, L. E. Tze, and T. W. Behrens. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J.Exp.Med.* 191 (5):883-890, 2000.
- 272.- F. H. Durie, A. Aruffo, J. Ledbetter, K. M. Crassi, W. R. Green, L. D. Fast, and R. J. Noelle. Antibody to the ligand of CD40, gp39, blocks the occurrence of the acute and chronic forms of graft-vs-host disease. *J.Clin.Invest.* 94 (3):1333-1338, 1994.
- 273.- B. R. Blazar, P. A. Taylor, A. Panoskaltis-Mortari, J. Buhlman, J. Xu, R. A. Flavell, R. Komgold, R. Noelle, and D. A. Vallera. Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J.Immunol.* 158 (1):29-39, 1997.
- 274.- S. B. Gauld, J. M. Dal Porto, and J. C. Cambier. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 296 (5573):1641-1642, 2002.
- 275.- S. B. Gauld, J. M. Dal Porto, and J. C. Cambier. http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_6909. Mayo, 2002.
- 276.- A. J. Cunningham. Large numbers of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes. *Nature* 252 (5485):749-751, 1974.
- 277.- E. N. Tsitsikov, N. Ramesh, and R. S. Geha. Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol.Immunol.* 31 (12):895-900, 1994.
- 278.- T. Higuchi, Y. Aiba, T. Nomura, J. Matsuda, K. Mochida, M. Suzuki, H. Kikutani, T. Honjo, K. Nishioka, and T. Tsubata. Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J.Immunol.* 168 (1):9-12, 2002.
- 279.- S. D. Khare, I. Sarosi, X. Z. Xia, S. McCabe, K. Miner, I. Solovyev, N. Hawkins, M. Kelley, D. Chang, G. Van, L. Ross, J. Delaney, L. Wang, D. Lacey, W. J. Boyle, and H. Hsu. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (7):3370-3375, 2000.

El presente trabajo se realizó en el La Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes, del Hospital de Especialidades del Centro Medico Nacional siglo XXI, IMSS, en México D.F.; en la Immunobiology Section, Howard Hughes Medical Institute. Yale School of Medicine, en New Haven, CT. EUA; y en el Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos, México.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico de la Fundación UNAM, a través del programa de apoyo a estudiantes distinguidos para estancias en el extranjero (Jesús Martínez B, 1996); The Howard Hughes Medical Institute (Jesús Martínez B, 1997); Programa de Beca-Crédito del CONACyT e Instituto Mexicano del Seguro Social (Jesús Martínez B, 1997-2000), Proyecto 308999-M de CONACyT (José Moreno Rodríguez, 2000-2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Does CD40 Ligation Induce B Cell Negative Selection?¹

Jesús Martínez-Barnetteche,* Vicente Madrid-Marina,[†] Richard A. Flavell,[‡] and José Moreno*[§]

Binding of CD154 to its receptor, CD40, provides costimulation for mature B cell activation and differentiation in response to Ag receptor signals. In mice, early B cell precursors express CD40, but its function at this stage is unknown. We examined the effects of CD40 ligation during B cell ontogeny in transgenic mice constitutively expressing CD154 on B cells (κEP-CD154). Precursors beyond pro-B cells were absent in adult bone marrow but were increased in the fetal liver. Newborn κEP-CD154 mice had largely increased numbers of peripheral B cells, which were CD154⁺, and that 36 h after birth expressed high surface levels of CD23 and MHC class II, resembling activated mature B cells. Nevertheless, κEP-CD154 mice were hypogammaglobulinemic, indicating that the expanded population of apparently activated B cells was nonfunctional. Further analysis revealed that soon after birth, κEP-CD154 mice-derived B cells became CD5⁺/Fas⁺, after which progressively decreased in the periphery in a CD154-CD40-dependent manner. These results indicate that CD40 ligation during B cell ontogeny induces negative selection characterized by either hyporesponsiveness or an arrest in maturation depending on the time of analysis and the anatomic site studied. *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 1042–1049.

T cell-dependent B cell activation begins with B cell Ag receptor (BCR)³ cross-linking, followed by costimulatory molecule and cytokine signals (1–3). The best characterized costimulatory signal for B cells is delivered by activated T cells by means of the TNF family molecule CD154 to CD40, a TNFR family member (4–7). The biological effects induced by CD40 ligation on B cells include: proliferation (8, 9), differentiation into Ab-secreting cells (7, 10, 11), and isotype-switching (7, 12–14).

During ontogeny, B cell precursors sequentially express several genes and receptors, some of which are involved in their maturation. The CD40 receptor is expressed during B cell ontogeny but its possible function in early B cell precursors is unknown. In mice, CD40 expression was first detected at the pre-B cell stage (15), differing from humans, where CD40 is first seen on pro-B cells (4).

The majority of information on the role of CD40 in B cell function relates to its positive effects on proliferation and differentiation. However, depending on the stage of differentiation and/or functional state, CD40 can also negatively influence B cells (16, 17). Thus, CD40 plus BCR signaling on immature B cells leads to tolerance and Fas-FasL dependent exclusion from germinal centers

(16). Moreover, under certain circumstances, CD40 ligation stops terminal B cell differentiation in mice (17) and can also inhibit Ig secretion by human tonsillar IgD⁺ memory B cells (18).

In normal individuals, autoreactive B cells are inactivated in different ways leading to tolerance. After BCR signaling, mainly in the periphery, immature IgM⁺ B cells follow one of three fates: receptor editing (19, 20), clonal deletion (21), or clonal anergy (22). Although CD40 appears to participate in B cell clonal anergy (23, 24), its possible role in other forms of B cell tolerance has not been clarified.

However, abnormal CD154 expression can induce a pathological state. Thus, constitutive CD154 expression in the skin results in T cell-mediated local autoimmune disease, through activation of Langerhans dendritic cells, in addition to autoantibody-mediated systemic connective tissue disease (25). The latter could be due to a direct effect of CD154 on B cells, leading to B cell hyperresponsiveness to BCR signaling, which in the case of self-reactive B cells would result in autoantibody switch recombination and secretion (7, 14). Most pathogenic autoantibodies bear isotypes which are dependent of CD40-CD154 interactions such as IgG. It was reported that peripheral blood B cells of systemic lupus erythematosus patients (27–29), as well as mice models of systemic lupus erythematosus (30) constitutively express CD154. However, its possible role in the pathogenesis of autoantibody production was not examined. Although normal B cells have also been found to express CD154 (31,32), its meaning is unknown.

CD40 ligation could also influence B cell fate during positive and/or negative selection, as suggested by the increase in autoreactive B cells in human CD154 deficiency (33). Thus, while CD154-CD40 is necessary for terminal B cell differentiation and pathogenic autoimmunity, its absence alters shaping of the B cell repertoire.

To gain insight on the effects of augmented CD40 ligation on B cells, and to examine a possible role of CD154-CD40 in B cell ontogeny *in vivo*, we generated transgenic mice (tgM) with selective expression of CD154 by B cells. Although these mice have an early expansion of B cells, adult mice show a profound reduction of the peripheral B cell compartment due to both peripheral loss and failure of B cell maturation during early stages of bone marrow (BM) (2) lymphopoiesis.

*Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México City, Distrito Federal, México; †Department of Molecular Virology, Center for Research in Infectious Diseases, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México; ‡Section of Immunobiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520

Received for publication October 9, 2001. Accepted for publication November 29, 2001.

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.

¹This work was partially supported by Grant 30899-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to J.M.). J.M.-B. was supported by scholarships from Fundación Universidad Nacional Autónoma de México, México Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and Instituto Mexicano del Seguro Social. R.A.F. is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

²Address correspondence and reprint requests to: Dr. José Moreno, Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 73-032, 03020 México, D. F. México. E-mail address: jmoreno49@prodigy.net.mx

³Abbreviations used in this paper: BCR, B cell Ag receptor; BM, bone marrow; HEL, hen egg lysosome; LN, lymph node; tgM, transgenic mice; WT, wild type.

Materials and Methods

Plasmids and constructs

The CD154 cDNA (kindly provided by Dr. M. Berton, University of Arizona, Tucson, AZ (34)) was inserted in a plasmid containing the K14 β -globin cassette (kindly provided by Dr. E. Fuchs, University of Michigan, Ann Arbor, MI), where the K14 promoter was substituted by a 1.6-kb κ fragment of the plasmid pKenVsp, a gift of Dr. U. Storb (University of Chicago, Chicago, IL; Fig. 1a), which contains a cassette with the ν intronic enhancer, linked to the ν promoter. To excise the entire κ enhancer/promoter cassette, a second *HindIII* site of pKenVsp located between the enhancer and promoter was eliminated by partial *HindIII* digestion, followed by isolation of the linearized plasmid, which was then filled-in with Klenow DNA polymerase and re-ligated with T4 DNA ligase (Life Technologies, Rockville, MD). The κ enhancer/promoter cassette was subcloned by blunt ligation of a filled-in *HindIII*-*XbaI* fragment into a filled-in *XbaI* site of the CD154/K14 plasmid, where the 0.8-kb human β globin intron was left downstream of the promoter as a splicing donor, followed by CD154, and the 3' untranslated region of the human K14 gene, respectively. We refer to this construct as κ EP-CD154.

Mice

IgM expressing CD154 on B cells (κ EP-CD154 mice) were generated by microinjection of (C57BL/6X31F)₁ zygotes with a *HindIII*-*EcoRI* 3.6 kb fragment of κ EP-CD154 containing the Ig κ regulatory elements, CD154 cDNA, plus K14-splicing and poly(A) signals. The potentially transgenic progeny was screened by Southern blot of 10 μ g *XbaI*-digested tail genomic DNA with a [³²P]dCTP-labeled 0.8-kb human β -globin probe. Further screening was conducted in genomic tail DNA by PCR amplification of a CD154 cDNA 0.8 kb fragment with the primers: 5'-GGA ATT CTG CAG ATC ATG ATA GAA ACA-3' and 5'-GGG CCC TCT AGA ACA GCG CAC TGTTCA-3' in 1 \times PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, at 95°C, 55°C, and 72°C for 30 s each, for 35 cycles.

CD40 KO in 129/v background mice (kindly provided by Dr. R. Geha, Harvard Medical School, Boston, MA; Ref. 35) were maintained in 129/v background and were crossed with κ EP-CD154 mice. Screening of CD40^{-/-} progeny was conducted with appropriate primers by PCR as described (35) and homozygosity for null CD40 alleles was determined by flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocytes with anti-CD40-PE-conjugated mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA).

C57BL/6 MD4 anti-hen egg white lysosome (HEL) Ig transgenics (22), were maintained in C57BL/6 background and identified by flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocytes with anti-B220-FITC-conjugated mAb and biotinylated HEL, followed by streptavidin-PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Due to the virtual absence of peripheral B cells, screening of κ EP-CD154 MD4 double IgM was achieved by PCR as described in <http://www.jax.org/resources>.

Because most κ EP-CD154 had growth retardation, reduced lifespan (an average of 6 mo), and lower breeding capacity than normal mice, they were maintained in a 129/v CD40^{-/-} background, which improved their health status. F₁ crosses of κ EP-CD154/CD40^{-/-} with C57BL/6 mice were used for most experiments. All mice strains were maintained in the conventional facility at the Instituto Nacional de Salud Pública (Cuernavaca, Mexico). All mice experiments were performed in compliance with international and institutional guidelines, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Coordinación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico.

Semiquantitative southern RT-PCR

Total RNA was obtained from tissue homogenates in Trizol reagent (Life Technologies) according to manufacturer instructions with a second extraction to ensure elimination of genomic DNA. A total of 5 μ g RNA was reverse-transcribed with Superscript II RT (Life Technologies) and 175 reaction volume was amplified by PCR with the oligonucleotide pairs: CD154 *Cp39F* (363–385): 5'-GGA TCC TCA AAT TGC AGC ACA CG-3' and CD154 *Isozer* (891–917): 5'-CTC TCA GAT CCA ATG CTG GGC TTC AGC-3' described by Armitage et al. (36) for CD154 expression and, as an internal control with β -actin primers 5'-CCA AGC CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3' and 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3'. The CD154 primers amplify a 257 bp fragment spanning exons 4 and 5. WT mice allow the distinction between the transgenic and endogenous CD154. After a 15 cycle amplification, samples were run in 2% agarose gels and transferred onto nylon membranes (HyBond N; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, U.K.) in 20 \times SSC, then hybridized at 60°C with alkaline phosphatase-labeled CD154 and β -actin cDNA probes, detected with a chemiluminescent kit according to man-

ufacturer instructions (AlkPhos; Amersham Pharmacia) and exposed for 1 h to Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia).

Lymphoid cell preparations

Spleen cells were obtained in FACS buffer (PBS, pH 7.4, 2% FBS, 5 mM EDTA, 1% rabbit serum, and 0.1% NaN₃) by dissociation of spleens between frosted glass slides. BM cells were obtained by injecting 0.75 ml of FACS buffer in one end of the femur, and collecting the cells at the other end. Fetal liver cells were obtained from timed matings of the different mice combinations, as described for spleen cells. Contaminating RBC in all cell suspensions were eliminated with 0.16 M NH₄Cl buffer, and then washed twice in FACS buffer. The total cell number in each suspension was estimated by counting in a hemocytometer.

Cell staining and flow cytometry analysis

A total of 1 \times 10⁶ cells were reacted in FACS buffer for 20 min on ice with combinations of the following conjugated mAb: anti-B220/CyChrome or FITC, anti-CD43 (S7)-PE, anti-BP-1-FITC (Ly-64), anti-CD23-PE, anti-FAS (Jo2)/biotin, anti-CD24-biotin (30-F1), anti-IgM (LoMe9)-FITC, anti-IgD-biotin, anti-CD40-FITC, anti-CD154 (MR1)-biotin, anti-CD5-PE, and anti-Ty1.2-biotin (BD Pharmingen). In experiments with MD4 IgM, specific B cells were labeled with biotinylated HEL. Streptavidin-FITC, streptavidin-PE or streptavidin-PerCP (BD Pharmingen) were used as a second label for biotin-conjugated reagents. Samples were run on a dual laser FACSCalibur and analyzed with CellQuest software (BD Immunocytometry Systems, Mountain View, CA).

Serum Igs

These were determined by an ELISA method with biotinylated rabbit anti-mouse isotype-specific Abs followed by HRP-labeled streptavidin in polystyrene plates (Nunc, Roskilde, Denmark) coated with polyvalent goat anti-mouse Ig. Plates were read in an automated ELISA reader (LabSystems, Helsinki, Finland) at 492 nm. All ELISA reagents were purchased from Zymed Laboratories (San Francisco, CA).

Results

κ EP-CD154 mice

Six of 10 κ EP-CD154 transgenic founders were runted, and died before 4 wk of age, which precluded further analysis. The remaining four founders were backcrossed to C57BL/6 mice for further analysis. Semiquantitative RT-PCR showed maximal transgene expression in the spleen, followed by lymph nodes (LN), thymus, lung, and adult liver (Fig. 1c).

Decreased number of peripheral B cells in adult κ EP-CD154 mice

Preliminary flow cytometric analysis aiming at defining transgene expression in 8-wk-old κ EP-CD154 mice revealed a marked decrease of B220⁺ cells in peripheral blood, LN, spleen, BM, and peritoneal cavity (not shown). The microscopic architecture of LN and spleen was abnormal with increased white pulp, poorly defined follicles, and absent germinal centers (Fig. 2). As these findings were consistent in all surviving transgenic lines, the results presented hereafter derive from analysis of one representative line, 28.

Although spleens of 10- to 12-wk-old κ EP-CD154 mice had about half the total cell number as nontransgenic littermates, B cells were decreased by at least 15-fold (Fig. 3a). This was more evident in LN, where B220⁺ cells were less than 3% (data not shown). The few remaining B220⁺, but no other cells, in the spleens of κ EP-CD154 mice expressed low density CD154 (Fig. 1b). Additional findings included slightly increased T cell numbers and greatly increased Mac-1⁺/Gr-1⁺ cells in spleens and LN of 10- to 12-wk-old κ EP-CD154 mice (data not shown). The B cell defect in κ EP-CD154 mice was due to CD154-CD40 ligand-receptor interaction, as B cell numbers in adult κ EP-CD154-transgenic-CD40^{-/-} mice (35) were normal (Fig. 2b).

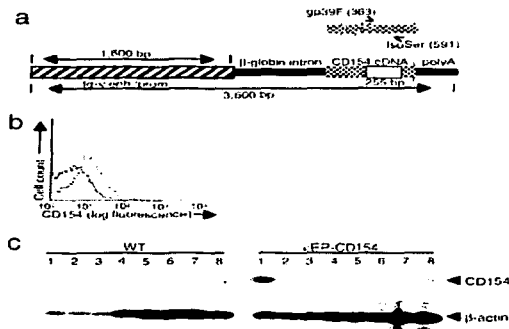


FIGURE 1. Generation and characterization of κ EP-CD154 IgM. *a*, Construct used to generate κ EP-CD154 mice and primers used to amplify CD154 message by RT-PCR. The upper part shows primer annealing with CD154 exons four and five. *b*, FACS analysis with biotin-anti-CD154, followed by streptavidin-PE of splenocytes from 4- and 8-wk-old κ EP-CD154 (dotted lines) or normal (shaded histograms) mice, gated on B220⁺ cells (FITC-B220). *c*, Semiquantitative RT-PCR analysis of total RNA obtained from the indicated tissues of κ EP-CD154 or control mice amplified with primers for CD154 (*a*) or β -actin and hybridized with equivalent cDNA probes. Lanes: 1) spleen; 2) LN; 3) BM; 4) liver; 5) kidney; 6) CNS; 7) skeletal muscle; 8) lung.

Age-dependent B cell deficiency in κEP-CD154 mice

Ten to 12-wk-old κ EP-CD154 mice had few peripheral B cells, which in older mice were only vestiges. Therefore, we examined the κ EP-CD154 B cell compartment from newborn to adult animals in greater detail. Newborn κ EP-CD154 spleens, had twice total B cell numbers as control mice (Fig. 3c), indicating that during fetal life, B cells were generated and expanded in κ EP-CD154 mice. At two weeks, κ EP-CD154 mice had enlarged spleens (Fig. 2a) and the number of peripheral B cells was even larger, until 4 wk, when both relative and absolute B cell counts progressively declined until almost absent (Fig. 3c). These data suggest that the B cell defect in κ EP-CD154 mice, is due to a peripheral loss that occurs after birth.

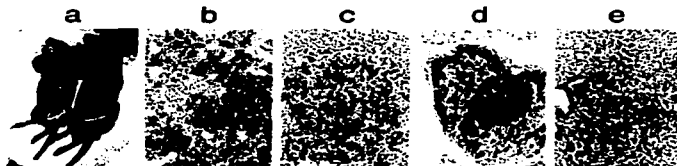


FIGURE 2. Retarded growth, splenomegaly, and abnormal lymphoid tissue in κ EP-CD154 IgM. *a*, Macroscopic view of a κ EP-CD154 mouse (*left*) and control littermate (*right*), showing the retarded growth and the enlarged, whitish spleen. *b*, Panoramic view of κ EP-CD154 spleen revealing an altered organization and predominant white pulp (H&E $\times 10$, Opto 2.5). *c*, A closer view of the spleen showing the increase of proliferating cells (H&E $\times 20$, Opto 3.3). *d*, Tracheal LN of κ EP-CD154 mouse, showing diffuse hyperplasia, disruption of normal architecture of the follicular areas, and virtual absence of germinal centers (H&E $\times 10$, Opto 4). *e*, κ EP-CD154 liver showing nodular lymphoid infiltrates and hematopoietic foci in portal spaces and acini (H&E, $\times 10$, Opto 4).

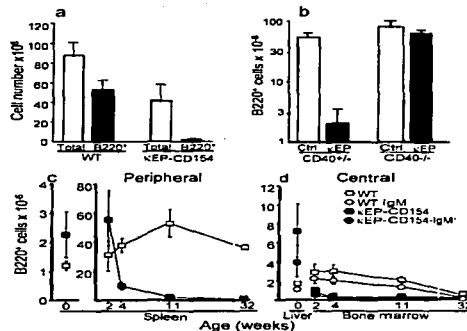


FIGURE 3. *a*, B cell deficiency in adult κ EP-CD154. Absolute number of splenocytes and B220⁺ cell counts from 10- to 12-wk-old κ EP-CD154 or normal mice. Results represent the mean \pm SEM of five independent analysis, WT, $n = 10$; κ EP-CD154, $n = 9$. *b*, CD40-CD154-dependent B cell loss in κ EP-CD154. Absolute B cell counts in spleens of CD40^{+/+}, CD40^{-/-} κ EP-CD154, CD40^{-/-}, and CD40^{-/-} κ EP-CD154 mice. Mean \pm SEM of two independent experiments are shown. *c*, Peripheral B cell compartment in κ EP-CD154 is expanded during early life followed by rapid and progressive B cell loss. Total B220⁺ cells in spleens from 1-2 days, and 2-, 4-, 10- to 12-, and 32-wk-old κ EP-CD154 (■), or littermate control mice (□). *d*, B lymphopoiesis in κ EP-CD154 is enhanced in neonatal liver but suppressed in adult BM. Total B (B220⁺) cells (squares) and B220⁺IgM⁺ (pro-B + pre-B, circles) cells in 1- to 2-day-old liver and 2-, 4-, 10- to 12-, and 32-wk-old mice BM. Data represent the mean \pm SEM of 14 independent analysis (WT, $n = 29$, κ EP-CD154, $n = 27$).

Deficient B cell maturation in the BM but not in the fetal liver of κEP-CD154 mice

During fetal life in mammals, B cell lymphopoiesis occurs in the liver, although after birth it takes place in BM (37). Fetal κ EP-CD154 mice appeared to have a spared B cell lymphopoiesis as indicated by the B cell expansion from birth to 2 wk of age. However, the inability to replenish the B cell compartment after this time suggested that in addition to the peripheral B cell loss, κ EP-CD154 BM was unable of generating new B cells. Hence, B220⁺ cells in BM or in newborn livers of κ EP-CD154 and nontransgenic

littermates, were examined by flow cytometry (Fig. 3*d*). As seen, while B220⁺ cell numbers in newborn κEP-CD154 mice livers were increased when compared with nontransgenic littermates, from 2 to 32 wk of age (the earliest and latest ages examined), total B220⁺ cells in BM of κEP-CD154 mice were markedly decreased. Thus, in κEP-CD154 mice, B cell lymphopoiesis is enhanced in the fetal liver, but it is profoundly impaired in the BM. Of note, both IgM⁺/B220⁺ and IgM⁺/B220⁺ cells were increased in the livers of newborn κEP-CD154 mice (see below).

B cell maturation in the BM of κEP-CD154 mice halts during or after the pro-B cell stage

B cell ontogeny in the liver and BM, in mice, are slightly different (37). However, in both sites, the earliest identifiable B cell precursor is B220^{low}/CD43⁺ (pro-B), whereas pre-B cells (the next stage of differentiation) are B220⁺/CD43⁻ (38). Therefore, we conducted a detailed two-color FACS analysis of B cell precursor profile in newborn liver and adult BM of κEP-CD154 mice to define at which stage was B cell ontogeny impaired in κEP-CD154 mice, and to establish possible differences between adult BM and newborn liver.

As shown in Fig. 4*a*, at all ages studied, the BM of κEP-CD154 mice had an almost complete absence of B220^{high}/CD43⁻ pre-B cells, but not of B220^{low}/CD43⁺ pro-B cells. In contrast, and as shown above, B220⁺ cells were increased in the livers of newborn κEP-CD154 mice. Indeed, all B cell precursors, regardless of their stage of maturation, were increased in the livers of newborn κEP-CD154 mice (Figs. 3*b* and 4*b*). Similar findings were obtained in 18-day fetal livers (data not shown).

B220 levels on newborn κEP-CD154 liver B cells (which in normal newborn mice are immature B cells) were higher than in controls (data not shown), resembling the phenotype of mature B cells. Control 32-wk-old BM had a reduced number of B cell precursors, which is age-related (37); yet, κEP-CD154 BM had one-tenth the number of pre-B cells. Finally, young κEP-CD154 mice had a considerable number of B220^{high}/CD43⁻ cells in the BM, which have been considered by some (38) as recirculating B cells.

Taken together, these results indicate that transition from pro-B to pre-B takes place in neonatal κEP-CD154 livers and their B220 levels resemble recirculating B cells (38), suggesting an accelerated rate of maturation, whereas in κEP-CD154 BM, B cell development stops during pro-B to pre-B cell transition. The fact that IgM⁻/B220⁺ cells, representing all B cell precursor stages before immature B cells, are also increased in the fetal liver, indicates that B cell expansion in fetal and newborn κEP-CD154 mice is due to a signal delivered in the fetal liver at either pro-B or pre-B cell

stages. As the only difference between κEP-CD154 and normal mice is the transgene (CD154), it seems reasonable to conclude that CD40 signaling at early stages of B cell ontogeny in the fetal liver or in the BM has distinct effects. Hence, CD40 ligation in the BM prevents B cell precursor maturation beyond the pro-B cell stage, whereas in the fetal liver, the same signal induces B cell expansion followed by early maturation and apparent elimination in the periphery.

Arrest of B cell differentiation in the BM and expansion in the fetal liver of κEP-CD154 mice occurs at a late pro-B cell stage

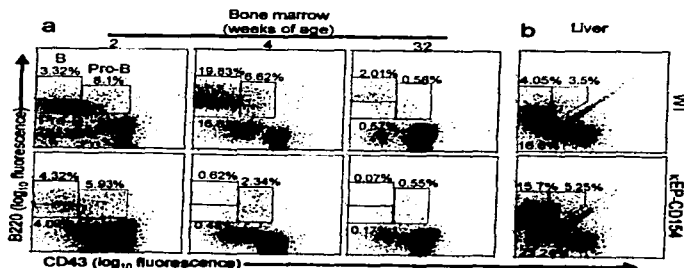
Expression by B220⁺/CD43⁺ cells of the heat-stable Ag (CD24) and Ly51 (BP-1) subdivide pro-B cells into three maturational stages (38). The earliest (fraction A) is CD24⁻/BP-1⁻, fraction B is CD24⁺/BP-1⁻, and fraction C is CD24⁺/BP-1⁺. To examine at which pro-B cell stage B cell ontogeny was arrested in κEP-CD154, BM cells were examined by four-color FACS analysis for B220, CD43, CD24, and BP-1 expression. Fig. 5*a* shows that A and B fractions (CD24⁻/BP-1⁻ and CD24⁺/BP-1⁻, respectively) were present in the BM of 6- to 8-wk-old mice, whereas late pro-B cells (fraction C) were absent. Further analysis of B220⁺ cells with CD25 and c-Kit, as defined by Melchers and Rolink (Ref. 37; Fig. 5*b*) confirmed the marked decrease of B cell precursors after the small pre-B1 stage (CD25⁺/c-Kit⁻; see Ref. 37). This indicates that B cell precursor development in BM of κEP-CD154 mice halts after the first heavy chain gene rearrangement (D-J).

Similar to the findings by two-color FACS analysis of liver B cells with B220 and CD43, two-color analysis of κEP-CD154 liver cells with C-Kit and B220 revealed an increase of B220⁺/c-Kit⁻ B cells that include all stages of B cell differentiation beginning with small pre-B1 cells, further suggesting that the signal responsible for B cell expansion in the liver of κEP-CD154 mice is the same as the signal that prevents B cell maturation in the BM, most likely CD154-CD40.

B cell maturation in BM and in the fetal liver of κEP-CD154 mice is disturbed at the time of CD154-CD40 expression

As it was clear that changes in B cell ontogeny in newborn liver and adult BM κEP-CD154 were occurring at a discrete stage during late pro-B cell differentiation, we examined the expression of CD154 in κEP-CD154 mice and CD40 in normal B6 mice by three-color FACS analysis with B220 and CD43 plus CD40 or CD154. This was important because it was reported that, in mouse, CD40 is first expressed at the pre-B cell stage, whereas in the human, CD40 is first seen on pro-B cells. Fig. 6*a* shows that all B cell precursors in normal mice, including CD43⁺/B220⁺ cells

FIGURE 4. B cell lymphopoiesis is enhanced in the liver of κEP-CD154 mice, but arrested in the BM at the pro-B cell stage. *a*, FACS analysis of 2-, 4-, and 32-wk-old mouse BM stained with anti-B220-FITC and anti-CD43-PE. B220⁺/CD43⁺ pro-B cells, B220^{low}/CD43⁻ pre-B cells, and B220^{high}/CD43⁻ recirculating mature B cells are boxed and percentages are given. *b*, Representative two-color histograms of FACS analysis of newborn κEP-CD154 mouse or control littermate liver cells stained as in *a*.



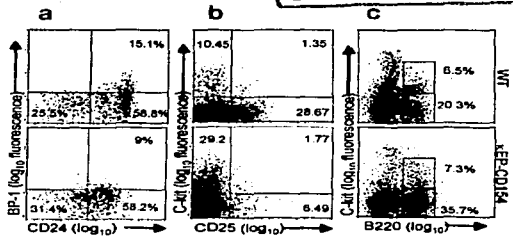


FIGURE 5. *a*, Absence of pro-B cell fraction C, but not fractions A and B in κEP-CD154. Resolution of the pro-B cell stage by four-color FACS analysis of gated B220⁺ (Per-CP)/CD43⁺ (PE) cells stained CD24-APC and BP-1-FITC. *b*, Marked reduction of CD25⁺ small pre-B1 cells in κEP-CD154. Further analysis of 6- to 8-wk-old BM B cell precursors with B220-FITC, c-Kit-APC, and CD25-PE. Plots represent c-Kit⁺ pro-B cells and CD25⁺ small pre-B1 cells in gated B220⁺ cells. *c*, B cell expansion in κEP-CD154 liver. Dual-color staining of liver cells with anti-B220 and anti-c-Kit (B220⁺/c-Kit⁺ early pro-B cells and B220⁺/c-Kit⁻ pre-B and mature B cells).

(pro-B) were CD40⁺. Similarly, B220⁺ cells in the liver and BM of κEP-CD154 mice were CD154⁺ (Fig. 6*b*). This indicates that the arrest of pro-B cell differentiation in κEP-CD154 BM, as well as B cell expansion in the liver, are coincident with CD40 and CD154 expression. The earliest stage where CD154 was expressed in κEP-CD154 B cell precursors was in pro-B cells (data not shown).

B cells from young κEP-CD154 mice have an activated phenotype

The finding that B220⁺ cells in young κEP-CD154 mice were increased after the expression CD40 and its ligand, suggested that CD154-CD40 B-B cell interaction in the fetal liver was

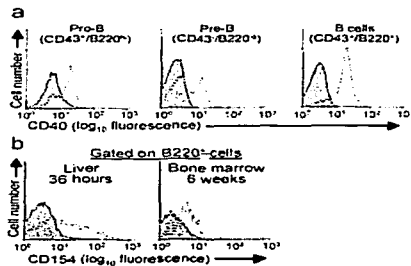


FIGURE 6. *a*, CD40 expression by B cells and precursors since the pro-B stage in normal mice. FACS analysis of non-transgenic B6 (dotted lines) and CD40^{-/-} (shaded histograms) mice BM cells reacted with biotin-anti-CD40, plus streptavidin-PE on B220-Per-CP plus CD43-PE gated cells. *b*, CD154 expression in κEP-CD154 mice starts in pro-B cells. FACS analysis of κEP-CD154 mouse liver (left) and BM (right) cells reacted with biotin-anti-CD154, plus streptavidin-PE on B220⁺ gated cells (FITC).

inducing expansion of B cell precursors, which could no longer be found in the periphery beyond four wk of age. Therefore, it was important to examine the functional and phenotypic consequences of CD40 signaling during fetal B cell ontogeny in newborn and young adult κEP-CD154 in peripheral B cells. Initial analysis of the cell cycle in 7-wk-old κEP-CD154 mice showed that among the few B cells remaining in their spleens, the proportion of cells in S, G₂, and M phases of the cell cycle was higher than in normal controls (data not shown). Fig. 7*a* and *b*, show that, while at birth, splenic κEP-CD154 B220⁺ cells had the same phenotype as controls. As early as 36 h later, κEP-CD154 B cells expressed continuously increasing levels of CD23 and MHC class II. Moreover, their cell size was increased as demonstrated by a higher forward scatter (data not shown). These results indicate that perinatal engagement of CD40 on κEP-CD154 B cells or their precursors, most likely in the fetal liver, induce early maturation and expression of activation markers. Thus, homotypic pro-B or pre-B cell CD40-CD154 interaction in fetal κEP-CD154 mice liver appears to induce functional changes on their progeny reminiscent of B cell activation, followed by peripheral loss.

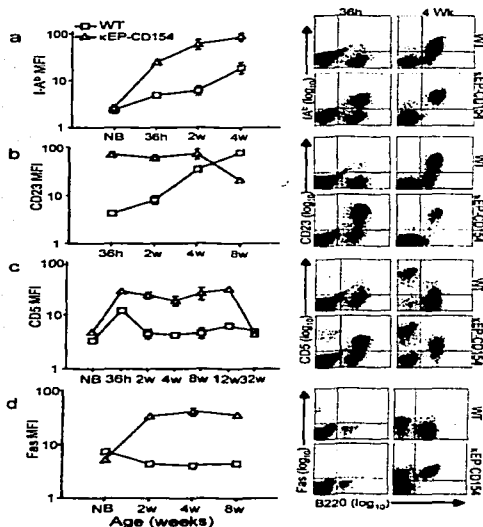


FIGURE 7. *a* and *b*, Early maturation and acquisition of an activated phenotype by B cells in newborn κEP-CD154. *Left*, Mean fluorescence intensities of IA^b and CD23 in gated B220⁺ splenic cells at the indicated ages. *Right*, Representative two-color histograms of splenic cells stained with B220-FITC and anti-IA^b-PE (*a*) or CD23-PE (*a*) in mice of the indicated ages. *c* and *d*, Increased CD5 and Fas (CD95) expression by splenic κEP-CD154 B cells. The experiments were performed as described in *a* and *b*, but this time stained with anti-CD5-PE or biotin-anti-Fas plus streptavidin-PE.

The activated B cells of young κ EP-CD154 mice are not functional

Anergic B cells, before their elimination, express activation markers and are excluded from entering the spleen follicles, after which they are eliminated (16). The activated phenotype of the increased B cells found in young κ EP-CD154 mice suggested that these cells could be undergoing clonal inactivation before being apparently eliminated in the spleen. Therefore, we indirectly examined the functional status of κ EP-CD154 mice B cells in vivo by measuring serum Ig levels. Two-week-old κ EP-CD154 mice had slightly increased IgM, but normal or decreased levels of all other Ig isotypes (Fig. 8). These were even lower when corrected for the total B cell number at each stage (data not shown), and considering that, at least part of the Ig detected was maternally-derived. Thus, despite the high numbers of activated B cells present, young κ EP-CD154 mice do not have increased serum Igs, indicating that B cells in young κ EP-CD154 mice are not functional, probably anergic.

Peripheral κ EP-CD154 B cells acquire expression of Fas and CD5, after which they can no longer be detected

Peripheral elimination of anergic B cells is mediated by T cells in a CD95 (Fas)-CD40L-BCR-dependent manner (16). Moreover, other studies have indicated that B-2 type B cells can express CD5 (39), which has been associated to tolerance induction (40). Therefore, we examined the expression of CD95 and CD5 by κ EP-CD154 B cells. As seen in Fig. 7, c and d, in parallel with their acquisition of activation markers, κ EP-CD154 B cells became Fas⁺/CD5⁺, remaining positive as they progressively decreased. Thus, the expanded B cell population in κ EP-CD154 mice express surface molecules, which are involved in deletion or tolerance induction and resemble clonally anergic B cells.

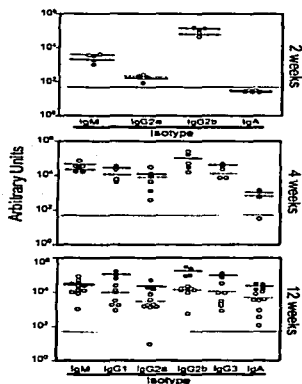


FIGURE 8. Decreased serum Igs in κ EP-CD154 mice. Serum Ig levels of control (●) or κ EP-CD154 (○) mice at two, four, and 12 wk. Lines (κ EP-CD154 dotted, control, continuous) represent mean values. Results are expressed as arbitrary units defined as the reciprocal value of the dilution necessary to reach an OD of 0.5 at 492 nm, and are not corrected for the number of B cells.

CD5⁺ B cells in κ EP-CD154 are B-2 type B cells

Many authors have long considered CD5 as a marker for the B-1 type B cell subset, which uses different sets of H and L chain V region segments (41). Transgenic expression of rearranged Ig genes that use V regions belonging to either B-1 or B-2 type B cells leads to development of only the B cell subset corresponding to the V region in the rearranged gene (42). To determine whether the CD5⁺ B cell population present in κ EP-CD154 mice represented B-1 or B-2 type B cells, κ EP-CD154 mice were crossed to mice carrying rearranged transgenic B-2 type Ig H and L chain genes specific for IHEL (22). This experiment was important for two reasons: first, to define if expression of a rearranged Ag receptor before CD40 ligation could rescue B cell precursors; second, because these mice should only develop B-2 type B cells, and therefore, if CD5 were only a B-1 cell marker, no CD5⁺ cells would be found in double IgM for anti-IHEL- κ EP and CD154. Fig. 9 shows that IHEL-binding B cells in anti-IHEL- κ EP-CD154 double IgM were CD5⁺ with no remarkable differences to κ EP-CD154 mice. These results indicate that CD5⁺ B cells in both κ EP-CD154 and anti-IHEL- κ EP-CD154 double IgM are B-2 type B cells and are, therefore, in agreement with observations, that CD5 expression by B cells is not restricted to the B-1 subset (39). Moreover, no B-1 type Ab specificities were detected in κ EP-CD154 sera (data not shown). Although, Ig transgenes did not rescue anti-IHEL- κ EP-CD154 double IgM B cells from deletion, this was slightly delayed (not shown).

Discussion

We started these studies with the hypothesis that constitutive expression of CD154 by B cells would lead to B cell hyperactivity at least at two levels. During ontogeny, CD40-ligation could bypass tolerance induction in immature IgM⁺ B cells. On mature B cells, CD40-ligation could lead to hyperactivity and, possibly, autoimmunity. Unexpectedly, the result was the opposite, transgenic CD154 expression by B cells drastically decreased B cell numbers in adult mice. In contrast, during fetal life, CD154-CD40 interaction induced B cell expansion and expression of CD23, MHC-II, CD5, and Fas. These cells were functionally-impaired and were apparently deleted in the periphery.

The essential role of CD40 in mature B cell differentiation and isotype switching is beyond controversy. In addition, CD40 ligation rescues B cells from apoptosis in germinal centers during affinity maturation (43–46). However, the later is not so straightforward, as CD40 can also facilitate elimination of tolerant B cells in a T cell- and Ag-dependent manner (16–18). Ligation of CD40 plus Fas on the surface B cells rendered tolerant by BCR-signaling

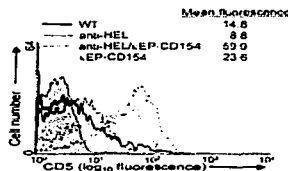


FIGURE 9. CD5 expression by κ EP-CD154 B-2 type cells. FACS analysis of spleen cells from non-IgM (WT), anti-HEL H and L chain-gene IgM (anti-HEL), double anti-HEL/ κ EP-CD154 or κ EP-CD154, stained with B220-FITC plus CD5-PE. Data shown are the overlay of representative histograms of cells gated in B220⁺ (green fluorescence).

when immature leads to their elimination (16), indicating that timing of BCR ligation is critical for the outcome of CD40-signaling. Moreover, CD40 ligation can inhibit proliferation and Ig secretion by normal human B cells (18), human or mouse B cell lymphomas (47), and hybridomas (48). Thus, CD40-signaling can mediate either B cell survival or death in different situations.

Studies on the role of CD40 during early B cell ontogeny are scarce and in some cases conflicting. In one study (49), CD40 ligation on human fetal BM pro-B cells (CD34⁺/CD10⁺) inhibited IL-7-induced proliferation *in vitro*, whereas in another, it induced surface Ig negative human B cell precursors to proliferate, acquire expression of CD23, and to become CD10⁺/surface Ig⁺, in response to IL-3 and other cytokines (50). Although it was reported that CD40 expression both at the cell surface and mRNA in mice begins in pre-B cells, which are refractory to *in vitro* CD40-stimulation (51), in the current studies, CD40 expression was evident from the pro-B cell stage both in normal and in κ EP-CD154 tgM and was functional *in vivo*, as demonstrated by the CD154-CD40-dependent B cell depletion in κ EP-CD154. It is unlikely that this merely reflects an increased susceptibility of pro-B cells to signal-induced cell death, as newborn κ EP-CD154 B220⁺ cells in liver and peripheral lymphoid tissues were expanded. Thus, the profound B cell deficiency in adult κ EP-CD154 mice was due to a halt on B cell ontogeny during pro-B to pre-B cell transition in the BM as well as to peripheral loss of fetal liver-derived B cells which resembled the phenotype found in anergic B cells.

CD40-mediated apoptosis has been described for transformed nonlymphoid cells (52), but the mechanism involved is unclear since the cytoplasmic tail of CD40 lacks the TNFR family death domains. We found that B cell precursors in adult BM, but not in the liver of newborn κ EP-CD154 mice, expressed Fas (not shown). However, in the latter, peripheral B cells expressed maturation and activation markers, and became Fas⁺ 36 h after birth. Although we did not show the involvement of Fas in the loss of B cells and their precursors in κ EP-CD154 mice, taken together the data suggests that Fas is involved in the apparent B cell deletion in this model, and could explain why this loss is delayed in liver-derived, but immediate in BM-derived B cells. As in mature B cells, CD40 stimulation of early B cell precursors could induce Fas expression, resulting in increased susceptibility to apoptosis (53, 54). Overall, what this implies is not readily apparent, but suggests that B cell development in the BM and in the liver, is governed by different signals.

The possibility that κ EP-CD154 B cells did not undergo CD40 ligation before leaving the liver and the CD154-CD40 signal was instead delivered in the periphery is unlikely for at least two reasons. First, liver B cells were expanded in κ EP-CD154, and the only possible explanation for this was an increased CD154-CD40 interaction. The second explanation requires the assumption that only B cell precursors receiving two signals were the targets of elimination/expansion, and if the same stimulus led to both events. The first signal is mediated through the BCR, and the second through CD40. If this is true, κ EP-CD154 pre-B cells would receive the dual signaling event. Although the signaling events following CD40 ligation in mature B cells are synergistic to BCR signaling, leading to a fully activated state; in immature B cells, BCR signaling leads to anergy or cell death (reviewed in Ref. 39).

What could the current findings mean in normal mice? The pre-BCR is a constitutively signaling molecule (37) that plays a role in positive selection of pre-B cells expressing a functional H chain, apparently without additional signals. In contrast, the BCR on immature B cells signals only after Ag-binding (which is predominantly the case for self-reactive B cells). This takes place in the periphery, in the presence of CD154 expressing cells, which do not normally appear to be present in the BM or liver. Hence, in the

periphery, only autoreactive, immature B cells would concomitantly signal through the BCR plus CD40. Such dual signaling would delete immature B cells, whereas CD40-only signaling allows immature B cells to continue their development into mature μ 6 B cells and further (55, 56). This hypothesis is in agreement with the finding that CD154-defective individuals have an expanded B cell repertoire and persistence of many autoreactive B cells (33). As there is no information in the literature concerning CD154 expression in the normal BM and in the present study, normal mouse BM did not contain CD154 mRNA (Fig. 1), we propose that this mechanism takes place mainly in the periphery. In κ EP-CD154 mice, B cell precursors undergo homotypic CD154-CD40 interaction at the time their pre-B cell receptor starts signaling. Like κ EP-CD154 mice, all cells with a functional pre-BCR receive both signals. We interpret this as that they are suffering the same fate as immature autoreactive B cells in the periphery of normal mice. The nature of the second signal could not be only restricted to CD40, as expression of other surface molecules, including other TNF-TNFR family members (57) can produce a similar effect. This could also have implications in pathologic states of immune stimulation, where activated T cells could enter the BM, thus providing CD40 signaling, which could impair B lymphopoiesis.

The failure of a functional BCR to rescue B cells in anti-HEL- κ EP-CD154 double tgM is not clear, as these mice should not have suffer B cell loss in the absence of their specific Ag or Ig crosslinking, unless low affinity BCR-Ag interactions were taking place in the BM, according to our hypothesis that BCR signaling plus costimulatory signals eliminate B cell precursors. The delayed B cell deletion seen in κ EP-CD154 mice suggest that additional mechanisms are involved.

One last relevant observation of the current studies was the finding that most B cells in κ EP-CD154 were CD5⁺, and that a transgenic B-2 type BCR did not prevent the expression of CD5. According to the hypothesis that B-1 or B-2 type phenotypes are dictated by the BCR V region usage, this indicates that these B cells are indeed B-2 and not B-1 type cells. CD5 expression by B cells is not restricted to the B-1 subset, as activated B-2 type B cells can express CD5 (39), which could be a marker of self-reactive B cells undergoing tolerance induction, as this phenotype resembles clonally inactivated B cells (16, 40), and is compatible with the hypogammaglobulinemia seen in young κ EP-CD154 mice. Thus, CD40 ligation on late pro-B or, perhaps, early pre-B cells prevents their maturation, which is immediate in the BM but delayed in the liver. Fetal liver-derived B cells in κ EP-CD154 mice move into in the periphery, after they further expand until 4 wk of age, after which they can no longer be found. Such expansion and apparent elimination is likely to take place in the spleen. The cellular mechanism responsible for this event was not defined, but it has been suggested that T cells are responsible for the elimination of clonally anergic B cells (16), which could be similar to our findings if the expanded B cell population in κ EP-CD154 indeed represents clonally anergic B cells. The roles of Fas and CD5 expression on B cell fate and function in κ EP-CD154 mice, respectively, deserve further studies.

Acknowledgments

We thank Debbie Butkus and Cindy Hughes for generation of tgM and Patricia Rojo for outstanding technical assistance. The critical comments of Drs. Leopoldo Santos-Argumedo, Edmundo Lamoyi, Laura Bonifaz, and Dario Vignali, and the invaluable help of Dr. Rogelio Hernández-Pando in the analysis of histologic data are greatly appreciated. We thank Drs. Raif Geha, Eliane Fuchs, Michael Berton, Ursula Storb, Yvonne Rosenstein, and others who made available their material to us.

References

1. Klaus, S. J., L. M. Pinchuk, H. D. Ochs, C. L. Law, W. C. Fanslow, R. J. Armitage, and E. A. Clark. 1994. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J. Immunol.* **152**: 3643.
2. Marshall, L. S., D. M. Shepherd, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, and R. J. Noelle. 1994. Signaling events during helper T cell-dependent B cell activation. I. Analysis of the signal transduction pathways triggered by activated helper T cell in resting B cells. *J. Immunol.* **152**:4816.
3. Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:331.
4. van Kooten, C., and J. Banheche. 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukocyte Biol.* **67**:2.
5. Green, K. A., R. J. Noelle, and W. R. Green. 1998. Evidence for a continued requirement for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in the progression of LP-BM15 retrovirus-induced murine AIDS. *Virology* **241**:260.
6. Schilizzi, B. M., R. Boonstra, T. H. The, and L. F. de Leij. 1997. Effect of B-cell receptor engagement on CD40-stimulated B cells. *Immunology* **92**:346.
7. Grewal, J. S., and R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol. Rev.* **153**:35.
8. Craxton, A., G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs, and E. A. Clark. 1998. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.* **161**:3225.
9. Newton, J. S., J. Li, Z. Q. Ning, D. E. Schoenfeld, J. D. Norton, and J. J. Murphy. 1996. B cell early response gene expression coupled to B cell receptor, CD40 and interleukin-4 receptor costimulation: evidence for a role of the *cgr-2/krox 20* transcription factor in B cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **26**:819.
10. Kindler, V., and R. H. Zubler. 1997. Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-12, IL-10, and IL-3. *J. Immunol.* **159**:2085.
11. Urashima, M., D. Chatham, M. Hatziyanni, A. Ogata, D. Hollenbaugh, A. Aruffo, and K. C. Anderson. 1996. CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk. Res.* **10**:307.
12. Renshaw, B. C., C. Fanslow III, R. J. Armitage, K. A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B. L. Davison, and C. R. Maliszewski. 1994. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**:1889.
13. Lederman, S., M. J. Yellin, A. M. Cleary, A. Pernis, G. Inghirami, L. E. Cohn, L. R. Covey, and C. Chess. 1994. T-B-A-N-CD40: a helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J. Immunol.* **152**:2163.
14. McCall, M. N., and P. D. Hodgkin. 1999. Switch recombination and germ-line transcription: two division-regulated events in B lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1447**:43.
15. Castigli, E., F. Young, A. M. Carosino, F. W. Alt, and R. S. Geha. 1996. CD40 expression and function in murine B cell ontogeny. *Int. Immunol.* **8**:405.
16. Rathmell, J. C., S. E. Townsend, J. C. Xu, R. A. Flavell, and C. C. Goodnow. 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* **87**:319.
17. Randall, T. D., A. W. Heath, L. Santos-Argumedo, M. C. Howard, I. L. Weissman, and F. E. Lund. 1998. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* **8**:733.
18. Miyashita, T., M. J. McIlraith, A. C. Grammer, Y. Miura, J. F. Aitrep, Y. Shimazaki, and P. E. Lipsky. 1997. Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* **158**:4620.
19. Chen, C., M. Z. Rudic, J. Erikson, S. A. Camper, S. Litwin, R. J. Hardy, and M. Weigert. 1994. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J. Immunol.* **152**:1970.
20. Lang, J., N. Teyton, A. Brunmark, K. Kane, and D. Nemazee. 1996. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultrahigh affinity, membrane-bound antigen. *J. Exp. Med.* **184**:1685.
21. Nemazee, D. A., and K. Burki. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing a 11C3 class II antibody gene. *Nature* **337**:562.
22. Goodnow, C. C., S. A. Adelstein, T. B. Lavie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Witherspoon, R. H. Loblay, and K. Raphael. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**:676.
23. Hirohata, S. 1997. The role of CD40-CD40 ligand interactions in suppression of human B cell responsiveness by CD4⁺ T cells. *Cell Immunol.* **182**:20.
24. Goodnow, C. C., S. A. Adelstein, A. Basten. 1990. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* **249**:1373.
25. Mehling, A., K. Losen, D. Varga, D. Metzger, T. A. Davies, T. Schwarz, S. Grabbe, and S. Beissert. 2001. Overexpression of CD40 ligand in murine epidermis results in chronic skin inflammation and systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **194**:613.
26. Datta, S. K. 1998. Production of pathogenic antibodies: cognate interactions between autoimmunity T and B cells. *Lupus* **7**:591.
27. Desai-Mehra, A., L. Lu, R. Ramsey-Goldman, and S. K. Datta. 1996. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J. Clin. Invest.* **97**:2063.
28. Dovi, B. S., S. V. Noorb, T. Krausz, and K. A. Davies. 1998. Peripheral blood lymphocytes in SLE—hyperexpression of CD154 on T and B lymphocytes and increased number of double negative T cells. *J. Autoimmun.* **11**:471.
29. Koshy, M., D. Berger, and M. K. Crow. 1996. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **98**:826.
30. Blossom, S., E. B. Chu, W. O. Weigle, and K. M. Gilbert. 1997. CD40 ligand expressed on B cells in the BXSD mouse model of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **158**:500.
31. Grammer, A. C., M. C. Bergman, Y. Miura, K. Fujita, L. S. Davis, and P. E. Lipsky. 1995. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J. Immunol.* **154**:4996.
32. Wiles, M. J., P. Boudsch, and D. Gray. 1998. Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur. J. Immunol.* **28**:548.
33. Lacroix-Desmazes, S., I. Resnick, D. Stahl, L. Mouton, T. Espanol, J. Levy, J. Kaveloge, M. Nottmann, M. Elst, A. Fischer, et al. 1999. Defective self-reactive antibody repertoire of serum IgM in patients with hyper-IgM syndrome. *J. Immunol.* **162**:5601.
34. Warren, W. D., and M. T. Berton. 1995. Induction of germ-line ν 1 and ϵ 1g gene expression in murine B cells. IL-4 and the CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. *J. Immunol.* **155**:3637.
35. Castigli, E., F. W. Alt, L. Davidson, A. Iottaro, E. Mizoguchi, A. K. Bhan, and R. S. Geha. 1994. CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-deficient blastocyst complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12133.
36. Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Brockhage, T. A. Sato, K. N. Chiford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, and C. R. Maliszewski. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**:80.
37. Mutschers, F., and R. Link. 1999. *B-lymphocyte development and biology*, 4th ed. W. E. Paul, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 183.
38. Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and J. D. Hayakawa. 1993. Resolution and characterization of Pro-B and Pre-Pro-B cell stages in normal mouse hematopoiesis. *Immunity* **7**:895.
39. Berland, R., and H. H. Wornis. 1998. An NFAT-dependent enhancer is necessary for anti-IgM-mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cells. *J. Immunol.* **161**:277.
40. Hippen, K. L., E. Tze, and T. W. Berens. 2000. CD5 maintains tolerance in energetic B cells. *J. Exp. Med.* **191**:883.
41. Kantor, A. B., and L. A. Herzenberg. 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:501.
42. Lam, K.-P., and K. Rajewsky. 1999. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B1 versus B2 cell development. *J. Exp. Med.* **190**:471.
43. Wang, Z., J. G. Karras, R. G. Howard, and T. L. Rothstein. 1995. Induction of bcl-x by CD40 engagement rescues sig-induced apoptosis in murine B cells. *J. Immunol.* **155**:323.
44. Han, S., K. Hatceck, B. Zheng, T. B. Kepler, R. Hodes, and G. Kelsoe. 1995. Cellular interaction in germinal centers: roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J. Immunol.* **155**:556.
45. Holder, M. J., H. Wang, A. E. Miller, M. Casanmayer, R. Armitage, M. K. Spriggs, W. C. Fanslow, J. C. MacLennan, C. D. Gregory, and J. Gordon. 1993. Suppression of apoptosis in normal and neoplastic human B lymphocytes by CD40 ligand is independent of Bcl-2 induction. *Eur. J. Immunol.* **23**:2368.
46. Liu, Y. J., D. Y. Mason, G. D. Johnson, S. Abbot, C. D. Gregory, D. L. Hardie, J. Gordon, and J. C. MacLennan. 1991. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **21**:1905.
47. Heath, A. W., R. Chang, N. Harada, L. Santos-Argumedo, J. Gordon, C. Hannum, E. A. Clark, A. B. H. Torres. 1993. Antibodies to CD40 ligand inhibit proliferation of murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells. *Clin. Immunol.* **152**:468.
48. Bergman, M. C., J. F. Aitrep, A. C. Grammer, and P. E. Lipsky. 1996. Ligation of CD40 influences the function of human Ig-secreting B cell hybridomas both positively and negatively. *J. Immunol.* **156**:1168.
49. Larson, A. W., and T. W. LeBlanc. 1994. Cross-linking CD40 on human B cell precursors inhibits or enhances growth depending on the stage of development and the IL-6 stimulus. *J. Immunol.* **153**:3584.
50. Smith, M. J., J. D. Owens, J. M. Wenzel, and J. Banheche. 1993. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *J. Exp. Med.* **178**:113.
51. Castigli, E., F. Young, A. M. Carosino, F. W. Alt, and R. S. Geha. 1996. CD40 expression and function in murine B cell ontogeny. *Int. Immunol.* **8**:405.
52. Hsu, S., and H. Engelmann. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* **183**:159.
53. Schatner, E. J., K. B. Elkun, D. H. Yoo, J. Tunang, P. H. Kramer, M. K. Crow, and S. M. Friedman. 1995. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J. Exp. Med.* **182**:1537.
54. Wang, J., J. Taniuchi, Y. Maekawa, M. Howard, M. D. Cooper, and T. Watanabe. 1996. Expression and function of Fas antigen on activated murine B cells. *Eur. J. Immunol.* **26**:92.
55. Flückiger, A.-C., E. Sanz, M. Garcia-Lloret, T. Su, Q.-L. Hao, R. Kato, S. Quan, A. de la Hara, G. M. Crooks, O. N. Witte, and D. J. Rawlings. 1998. In vitro reconstitution of human B-cell ontogeny: from CD34⁺ multipotent progenitors to Ig-secreting cells. *Blood* **92**:4309.
56. Barker, J., and C. M. Verfaillie. 2000. A novel in vitro model of early human adult B lymphopoiesis: differentiation of pro-B cells and differentiation to mature B lymphocytes. *Leukemia* **14**:1614.
57. Zhu, G. F. D., K. Tamada, Y. Sun, M. Rodriguez, Y.-X. Fu, and L. Chen. 2001. Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/IL-6-transgenic mice. *J. Immunol.* **167**:2677.