UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Doctorado en Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina

Determinación de los mecanismos moleculares del aumento en el procesamiento y presentación de antígenos por el estímulo de linfocitos B vía CD40

Tesis que presenta

Abigail Clatza Juárez

para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas

Tutor de tesis: Dr. José Moreno Rodríguez Co-Tutores: Dr. Carlos Rosales Ledezma Dr. Fernando Esquivel Guadarrama



Universidad Nacional Autónoma de México



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. Este trabajo está dedicado a mi familia, quienes me apoyaron Incondicionalmente en iniciar y concluir esta aventura. Muchas gracias por su apoyo y compresión.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. José Moreno por haberme permitido estar en su laboratorio, y por todo el apoyo profesional y personal que me brindo; a la Dra. Laura Bonifaz y el Dr. Armando Isibasi por sus sabios consejos; a Paty, Judith y Augusto quienes fueron excelentes compañeros y son inmejorables amigos; y especialmente a mi amigo, compañero, y esposo Gibrán, quien fue importante en este trabajo, y es parte fundamental de mi vida.

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Enrique Ortega Soto Secretario: Dr. José Moreno Rodríguez Vocal: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay Vocal: Dr. Edgar Zenteno Galindo Vocal: Dr. Leopoldo Flores Romo Suplente: Dr. Jaime Mas Oliva Suplente: Dra. Claudia González Espinosa

Tabla de Contenido

Abreviaciones	6
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Antecedentes	12
 Procesamiento y presentación de antígenos por MHCII 1.1 Estructura de las MHCII 1.2 Procesamiento de antígeno 	12 12 12
2Sinapsis inmunológica 2.1 Balsas Lipídicas y sinapsis inmunológica	17 22
3 Linfocitos B como CPA	25
4 CD40-CD154 4.1 Estructura 4.2 Expresión de CD40 4.3 Señalización a través de CD40 4.4 Importancia de la interacción CD154-CD40	26 26 27 27 28
5 CD40 y la función del linfocito B como CPA	32
Justificación	35
Planteamiento del problema	36
Hipótesis	37
Objetivos	38
Objetivo general	38
Objetivos particulares	38
Materiales y Métodos	39
Resultados	49
Discusión	83
Conclusiones	92
Referencias	93

Abreviaciones

AEP	Asparagil-endopeptidasa
BCR	Receptor antígeno específico del linfocito B
CLIP	Péptido de cadena invariante asociado a MHCII
CPA	Célula presentadora de antígeno profesional
DAG	Diacil-glicerol
DRC	Dominios ricos en cisteínas
EMR	Endocitosis mediada por receptores
GILT	Tiol reductasa inducible por Interferon γ
GPI	Glucosil-fosfatidil-inositol
HMS	Hipermutación somática
li	Cadena Invariante
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INFγ	Interferón γ
JNK	Cinasa terminal de c-Jun N-
Lamp	Proteína de membrana asociada a lisosomas
LAT	Adaptador para activación de linfocitos T
LIP	Péptido inducido por leupeptina
LG	Lisozima de gallina
MIIC	Compartimientos endocíticos enriquecidos en MHCII
MAPK	Proteína-cinasa activada por mitógenos
MHCII	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
ΝϜκΒ	Factor nuclear κΒ
NFAT	Factor nuclear de linfocitos T activados
m-βC	Metil-β-ciclodextrina
PKC	Protein-cinasa C
PLCγ	Fosfolipasa Cγ
PI3-K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
РМ	Peso molecular
РТК	Cinasas de tirosina

RE	Retículo endoplásmico
SAPK	Protein-cinasa activada por stress
SMAC	Complejo de activación supremolecular
TCR	Receptor antígeno específico del linfocito T
TGN	Trans Golgi
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis tumoral
TNFr	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
ZAP70	Proteína cinasa de 70 kDa asociada a la cadena ξ

Resumen

Una eficiente respuesta inmune depende de la activación de linfocitos T CD4 por células presentadoras de antígeno profesionales (CPA); que son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos. Éstas activan al linfocito T CD4 a través de interacciones entre las moléculas de sus membranas plasmáticas, formando la sinapsis inmunológica. En ésta el receptor antígeno-específico (TCR) del linfocito T CD4 reconoce los péptidos unidos a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHCII), expresados en la CPA. Este reconocimiento, induce la primera señal de activación, que en conjunto con señales derivadas de moléculas coestimuladoras, expresadas exclusivamente en CPA, permiten la activación del linfocito T CD4 y de la CPA misma.

Así, la eficiencia de activación del linfocito T CD4 depende de la capacidad coestimuladora de la CPA, que es mejorada por el estímulo a través de CD40. En este trabajo estudiamos los mecanismos por los cuales el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA. Para esto se utilizaron como CPA: linfomas de linfocitos B (LK-35.2) o linfocitos B de bazo, que se estimularon con un anticuerpo monoclonal agonista que reconoce CD40 o un anticuerpo control; e hibridomas de linfocitos T CD4 que reconocen péptidos derivados de la lisozima de gallina (LG) o linfocitos T CD4 de un ratón transgénico específico para la LG. Con este modelo confirmamos que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA, y encontramos que esto sucede en dos etapas. La primera ocurre rápidamente, después de una estimulación de 30 min.-3 h. con anti-CD40; y la segunda, que ocurre entre las 12 y 24 horas de estimulación. La primera etapa se asocia con una reorganización en la membrana plasmática de las MHCII y CD80 en balsas lipídicas clásicas, mientras que la tardía correlaciona positivamente con un aumento en la expresión de CD80 en superficie. Ambas etapas son independientes al procesamiento de antígeno. Esto, demuestra que la señalización de CD40 aumenta la eficiencia de la CPA para activar a linfocitos T CD4, al menos por dos mecanismos distintos.

Abstract

An efficient immune response depends on the activation of CD4 T cells by antigen presenting cells (APC): such as dendritic cell, B cells or macrophages. APC present specific antigenic peptides to the T cell receptor (TCR) and induce T cell activation by additional contacts between costimulatory molecules on the cell surfaces, in what has been called the "immunological synapse". The TCR of CD4 T cells specifically recognizes peptides bound to MHC class II molecules (MHCII), on the APC surface, providing the first activation signal, that together with reciprocal signals from costimulatory molecules on the APC lead to T cell and APC activation.

The efficiency of T cell activation depends of the costimulatory capacity of the APC, which is enhanced by CD40 ligation. In the present work, we examined the mechanisms whereby CD40 ligation increases B cell antigen presenting capacity. B cell hybridoma line LK-35.2 or normal spleen B cells were stimulated with an agonistic antibody against CD40 or not and were used as APC for a series of hen egg white lysozyme (HEL)/specific T cell hybridomas or normal T cells from anti-HEL TCR transgenic mice. As reported, CD40 ligation augmented the ability of B cells to activate T cells, which occurs in two stages. The first one occurs shortly (30 min to 3 h) after CD40-ligation, and the second one, takes 12-24 hours after CD40 ligation to fully develop. The short effect correlates with MHCII and CD80 progressive accumulation in cholesterol-enriched microdomains on the cell surface. The late enhancement of antigen presentation is more sustained and correlates with a significant increase in CD80 expression by the APC. CD40 ligation did not affect antigen processing. Thus, CD40 signaling enhances the efficiency of APC to activate T cells by at least two related, but distinct, mechanisms.

Introducción

La comunicación entre las células del sistema inmune, como en otros sistemas, es través de interacciones ligando-receptor, que en algunos casos ocurre entre moléculas que se expresan en la membrana plasmática; por lo que su interacción depende del acercamiento de éstas, formando la sinapsis inmunológica.

Existen diferentes tipos de sinapsis inmunológicas dependiendo de las células que la formen (linfocito T CD4-célula dendrítica/linfocito B, células NK/linfocito T CD8-célula blanco, timocitos-células del epitelio tímico), sus estadios de activación (linfocito T CD4 virgen-célula dendrítica madura/célula dendrítica inmadura, linfocito T CD4 virgen/activado- linfocito B virgen), y de las citocinas presentes en el microambiente. Esos factores influyen en la composición molecular de la sinapsis y su desenlace, el cual depende en gran medida, de la eficiencia de señalización de las moléculas ahí presentes. Así, por ejemplo, la sinapsis entre el linfocito T CD4 y la célula presentadora de antígeno profesional (CPA) puede resultar en activación o anergia, dependiendo de la expresión de moléculas coestimuladoras CPA^{1, 2}.

Así, para la activación de linfocitos T CD4 es indispensable la CPA, cuya función es presentarle el péptido antigénico unido a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHCII) y proporcionarle señales adicionales o coestimuladoras, necesarias para su activación. Las CPA profesionales son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos, cada una de ellas con funciones particulares. Las células dendríticas maduras son las CPA primarias y su principal función es la activación de los linfocitos T vírgenes³. Para los linfocitos B, su función como CPA tiene como objetivo esencial, obtener la cooperación del linfocito T CD4 para su propia activación y diferenciación, para generar una respuesta humoral frente antígenos timo-dependientes. Mientras que para los macrofágos, la presentación de antígeno tiene por objetivo su propia activación que le permite, entre otras funciones, eliminar a los microorganismos

intracelulares que los parasitan. Independientemente de su función, en todas las CPA, la activación a través de CD40, es indispensable para su maduración como CPA y en el caso de los linfocitos B y macrófagos para activar sus funciones ⁴.

De esta manera el estímulo a través de CD40 mejora la función de las tres CPA, lo cual se ha propuesto ser más relevante para el linfocito B; en el cual, entre otros efectos, aumenta la expresión de MHCII, ICAM-1, CD86 y CD80 en superficie, y posiblemente induce modificaciones en el procesamiento de antígeno. Estos cambios han sido relacionados con el aumento en la eficiencia del linfocito B como CPA; sin embargo, esto aún no se ha estudiado a detalle, lo cual es el objetivo de este trabajo.

Para facilitar la comprensión de este trabajo, iniciaremos los antecendentes con los principales aspectos de la interacción entre linfocitos T CD4 y CPA, con énfasis en linfocitos B como CPA, seguido del análisis del papel de CD40 en linfocitos B, principalmente en su función como CPA.

Antecedentes

Los linfocitos T CD4 reconocen péptidos unidos a MHCII, expresadas en la superficie de CPA. El reconocimiento de MHCII por el receptor de los linfocitos T CD4 (TCR), induce en el linfocito T una primera e indispensable señal de activación. Los péptidos presentados por las MHCII derivan de la degradación intracelular de proteínas predominantemente extracelulares. Los eventos intracelulares que participan en la degradación de proteínas, la formación y transporte de los complejos MHCII-péptido se denominan, en conjunto, procesamiento de antígeno^{5, 6}.

1 Procesamiento y presentación de antígenos por MHCII

1.1 Estructura de las MHCII

Las MHCII están formadas por dos cadenas polimórficas: la cadena α (32-34 kDa) y la cadena β (29-32 kDa), cada una integrada por dos dominios: uno proximal a la membrana (α 2 y β 2) y uno distal (α 1 y β 1). Los dominios α 1 y β 1 forman una hendidura en donde se unen péptidos con tamaño promedio de 10 a 15 aminoácidos, que generalmente provienen de la degradación de proteínas exógenas ya sea de la propia célula (cuando se localiza en la cara exoplásmica de la membrana celular de los organelos vesiculares y superficie celular) o endocitadas del medio⁷.

1.2 Procesamiento de antígeno

La formación de los complejos MHCII-péptido requiere de diferentes eventos, que por facilidad se describirán en tres secciones: 1) vía endocítica y generación de péptidos, 2) biosíntesis, ensamble y transporte de MHCII a la vía endocítica, 3) formación y transporte a la superficie celular de los complejos MHCII-péptido.

1.2.1 Vía endocítica y generación de péptidos

La vía endocítica está formada por diversos compartimientos y vesículas que se encuentran en continuo movimiento, fusionándose unas con otras, y generando nuevas vesículas que se fusionan con un nuevo compartimiento⁸. Este

dinamismo es regulado por proteínas que intervienen en el desplazamiento de las vesículas a través del citoesqueleto; o en su fusión, ya sea induciéndola o proporcionando la especificidad a ésta⁹⁻¹¹.

Debido a la complejidad de la vía endocítica y para facilitar su estudio, sus diferentes compartimientos se han dividido en: vesículas de reciclaje, endosomas tempranos, endosomas tardíos (endosomas mulivesiculares) y lisosomas. Estos compartimientos se clasifican con base en la expresión o contenido de distintas proteínas (GTPasas Rab, el receptor de transferrina, hexosaminidasa, Lamp1 y 2, etc.), además de su pH y densidad específica^{12, 13}. Adicionalmente a estos compartimientos, en las CPA se han descrito los compartimientos denominados *MIIC* (compartimientos enriquecidos en clase II). Estos se originan por la expresión de MHCII y de la cadena invariante (li), y se han propuesto ser un lisosoma especializado en el procesamiento de antígenos presentados por MHCII¹⁴⁻¹⁶

Los antígenos que son presentados por las MHCII ingresan a la vía endocítica por pinocitosis, macropinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores¹⁷. Una vez en la vía endocítica, el antígeno es transportado de endosomas tempranos a endosomas tardíos, y de ahí a los lisosomas. Durante este trayecto, el antígeno es degradado progresivamente por las diferentes proteasas residentes de la vía endocítica, siendo las más notables: las catepsinas (B, D, E, H, L y S), la Tiol reductasa inducible por INF γ (GILT), y la asparagil-endopeptidasa (AEP)¹⁷⁻²⁷. Estas proteasas trabajan en conjunto, generando o destruyendo péptidos con capacidad de unión a las MHCII, por lo que la unión final a éstas dependerá de múltiples factores, pero esencialmente de su generación y su vida media.

1.2.2 Biosíntesis, ensamble y transporte de MHCII a la vía endocítica

Simultáneamente a la generación de péptidos, las cadenas α y β de las MHCII son sintetizadas en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE); en donde se asocian a diferentes proteínas, siendo la cadena li la más importante.

Ésta es una glicoproteína transmembranal tipo II con diferentes funciones; una de ellas es la de chaperona, que permite el ensamble adecuado de las cadenas MHCII α y β dando lugar a la formación de nonámeros integrados por tres trímeros, cada uno formado por la interacción de una cadena li con un dímero $\alpha\beta$. En estos trímeros, una región de la cadena li denominada CLIP (péptido de cadena invariante asociado a moléculas MHC clase II), protege el sitio de unión al péptido, bloqueando la unión de péptidos a la molécula MHCII antes de su llegada a la vía endocítica, a la cual es dirigida por el motivo de dileucina de la región citoplásmica de la cadena li²⁸.

Los nonámeros $\alpha\beta$ -li son transportados de la red de Trans-Golgi a la membrana plasmática y de ahí a la vía endocítica²⁹⁻³¹, en donde la cadena li es secuencialmente degradada³². La degradación inicial de ésta, se debe a proteasas aspárticas y probablemente a AEP, que originan un fragmento denominado lip22 o LIP (péptido de cadena li inducido por leupeptina)^{7, 33-37}. Este fragmento es sustrato de proteasas de cisteína, que al degradarlo generan el fragmento lip10; que es sustrato de las catepsinas S, L y F, siendo la primera la que se expresa en todas las CPA³⁸⁻⁴⁰. La actividad de la catepsina S sobre la cadena li genera un último fragmento de ésta, denominado CLIP, el cual permanece asociado al sitio de unión del péptido en las MHCII, formando complejos $\alpha\beta$ -CLIP, que son los candidatos ideales para formar complejos MHCII-péptido⁴⁰⁻⁴⁵.

1.2.3 Formación y transporte a la superficie celular de los complejos MHCIIpéptido

Los complejos MHCII-péptido pueden formarse a lo largo de la vía endocítica, aunque esto es más eficiente en el *MIIC*, en donde se acumulan las MHCII, junto con DM⁴⁶. Ésta es una molécula expresada constitutivamente por las CPA, cuya función es promover la formación de complejos MHCII-péptido⁴⁷⁻⁵¹. Esto ocurre debido a que la interacción de DM con MHCII-CLIP, induce un cambio conformacional que relaja el sitio de unión de péptidos de las MHCII; lo que libera

el CLIP y permite la unión de péptidos, preferentemente con alta afinidad por la MHCII⁵²⁻⁵⁶.

Estudios recientes sobre la formación de complejos MHCII-péptido en el *MIIC*, sugieren que es un proceso dinámico que podría estar regulado por estímulos que modifiquen la morfología del *MIIC*, y la distribución de MHCII y DM. Con respecto al primero, se ha descrito que la morfología del *MIIC* varía dependiendo del estímulo que la CPA reciba. Así por ejemplo, en células dendríticas inmaduras el *MIIC* es un compartimiento multilaminar (tipo I), el cual se convierte en multivesicular (tipos II y III)⁵⁷ después después de recibir un estímulo inflamatorio (LPS, TNF) ⁵⁸⁻⁶¹. Adicionalmente al cambio en la morfología, el estímulo de maduración induce la transferencia de las MHCII de las vesículas internas del compartimiento multivesicular a la membrana limitante de éste, donde reside DM. Esta transferencia permite la interacción de MHCII con DM, favoreciendo la formación de Complejos MHCII-péptido de alta afinidad⁶². El bloqueo de la interacción de DM con MHCII, disminuye los complejos MHCII-péptido, lo cual se ha descrito puede servir como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune⁶³.

Una vez formado el complejo MHCII-péptido, éste es transportado a la membrana plasmática por un proceso poco entendido. En células dendríticas se ha descrito el transporte de las MHCII-péptido a la membrana plasmática a través de la formación de un compartimiento con características lisosomales⁶⁴. Posteriormente se describió, en estas mismas células, la formación de extensiones o túbulos desde el *MIIC* a la membrana plasmática, justo al sitio de contacto con el TCR. La formación de estas extensiones depende de la interacción TCR-MHCII-péptido y de señales originadas por receptores tipo Toll (TLR)⁶⁵⁻⁶⁸. Adicionalmente, en linfocitos B y células dendríticas, se ha encontrado movimiento del *MIIC* (el cual contiene los complejos MHCII-péptido), a través de microtúbulos, hacia la membrana plasmática con la que se fusiona, liberando vesículas denominadas exosomas. Éstas contienen complejos MHCII-péptido,

moléculas coestimuladoras y de adhesión, como CD86, CD54 (ICAM-1), respectivamente⁶⁹⁻⁷². La función de los exosomas no es muy clara, se ha descrito que inducen proliferación de linfocitos T CD4, aunque con una eficiencia de 10 a 20 veces menor que una CPA, y se desconoce por completo su función *in vivo*.



Procesamiento de antígeno para MHCII. Las MHCII son sintetizadas en el RE, y transportadas a la vía endocítica, donde se degradan la cadena li que acompaña a la MHCII y las proteínas internalizadas. La formación de MHCII-péptido ocurre en el *MIIC*, de donde son transportados a la membrana plasmática. Tomada del libro del Dr. José Moreno (en prensa).

Una vez que los complejos MHCII-péptido alcanzan la membrana plasmática estos pueden ser reconocidos por linfocitos T CD4 y activarlo, para lo cual, se requiere de una serie de interacciones moleculares, que forman la sinapsis inmunológica.

2.-Sinapsis inmunológica

Se han descrito diferentes tipos de sinapsis inmunológicas entre el linfocito T CD4 y la CPA, las cuales dependen de la identidad de la CPA, del estadio de activación y diferenciación de ambas células, y de la presencia de MHCII-péptido específicos⁷³⁻⁷⁵. Estos factores afectan la composición molecular y la duración de la sinapsis, así como la consecuencia para el linfocito T CD4, la cual puede ser: homeostasis, anergia o activación, siendo esta última la de nuestro interés.

Como hemos mencionado, la activación de los linfocitos T CD4 depende de la señalización inducida por el reconocimiento de las MHCII; y de señales accesorias, generadas por moléculas coestimuladoras. La principal molécula coestimuladora, en etapas tempranas de la activación del linfocito T CD4, es CD28; que al interaccionar con sus ligandos CD80/CD86 (expresados en la CPA), induce la expresión de interleucina 2 (IL-2), ICOS y CD154, que participan positivamente en la activación del linfocito T CD4⁷⁶.

Durante la sinapsis entre el linfocito T CD4 y la CPA, sus moléculas de superficie pueden redistribuirse formando una estructura monocéntrica denominada SMAC (complejo de activación supramolecular). Ésta se divide en: el c-SMAC (centro del SMAC), el p-SMAC (periferia del SMAC) y el d-SMAC (distal del SMAC)^{2, 77, 78}. Aunque la formación del SMAC resulta en activación, no es indispensable para ella. De hecho, se ha propuesto que la función del SMAC es mejorar la comunicación entre el linfocito T CD4 y la CPA, por medio de la concentración temporal de las moléculas que participan en la activación, y posteriormente, de las que regulan negativamente ésta⁷⁹.

De las sinapsis inmunológicas entre el linfocito T CD4 y la CPA, la monocéntrica (SMAC) es de la que se tienen más detalles y la que describiremos. Ésta, al igual que otras sinapsis, inicia con la interacción de baja afinidad entre las moléculas de adhesión: LFA-1 con sus ligandos ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, y CD2 con sus ligandos CD58 (humanos) y CD48 (en ratón), expresados en el linfocito T CD4 y

en la CPA, respectivamente. Estas interacciones acercan a las células permitiendo el reconocimiento de las MHCII con el péptido específico, lo que induce un aumento en la afinidad de sus moléculas de adhesión y rearreglo del citoesqueleto^{1, 80-82}. Estos cambios consolidan la interacción entre el linfocito T CD4 y la CPA, favoreciendo la formación del SMAC.

El reconocimiento de los complejos MHCII-péptido por el TCR inicia una cascada de señalización. En ésta la fosfatasa CD45 activa a la cinasa Lck, que su vez activa a la cinasa Fyn. Estas cinasas fosforilan los ITAM de las cadenas del complejo CD3 (especialmente CD3 ζ) y a la cinasa ZAP70 (proteína cinasa de 70 kDa asociada a la cadena ζ), la que fosforila a LAT (adaptador para la activación de linfocitos T). LAT es una proteína adaptadora, que recluta a PI3K (fosfatidil-inositol cinasa), SLP-76 y PLC γ (fosfolipasa C). La actividad de PI3K genera 3,4,5 fosfatidil-inositol-trifosfato, que sirve como sitio de anclaje a proteínas con dominios de pleckstrina, como AKT, la que participa en la remodelación del citoesqueleto. Por otro lado, PLC γ genera diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato, que aumentan el nivel de Ca²⁺ intracelular y activan a la proteína cinasa C- θ (PKC θ), respectivamente. El reclutamiento de estas moléculas intracelulares al sitio de reconocimiento de las MHCII, forma una plataforma de señalización denominada "señalosoma" ⁸³⁻⁸⁹.

Simultáneamente a la señalización intracelular, las moléculas de la membrana del linfocito T se redistribuyen, localizándose en el c-SMAC: el TCR, CD4, Lck, CD45 y proteínas integrantes del señalosoma; y en el p-SMAC: LFA-1 y CD2^{78, 90,91}. Con el tiempo y debido al reconocimiento del péptido antigénico, la distribución molecular cambia en el SMAC, localizándose en el c-SMAC: el TCR, CD28, CD154 y PKC0; el pSMAC: CD4, LFA-1 y CD2, y el d-SMAC: CD45 y CD43^{78, 89-93}.

De forma similar al linfocito T, la CPA después del contacto con éste, redistribuye sus moléculas para formar el SMAC. En el c-SMAC se localiza inicialmente, una

mezcla de las MHCII con péptidos agonistas o irrelevantes, y posteriormente, estos últimos son redistribuídos hacia el p-SMAC, en donde se localiza ICAM-1. Al parecer, la distribución inicial de las MHCII es importante para la activación del linfocito T CD4, en donde los complejos MHCII-péptido irrelevantes participan en la activación del linfocito T CD4 mediante interacciones de baja afinidad con el TCR. Estas interacciones pueden llevar a la activación de linfocitos T aún cuando las concentraciones del péptido específico son tan bajas como uno o dos péptidos ^{82, 94-97}. Después de la interacción TCR-MHCII, las moléculas CD40 y CD86 se concentran en el c-SMAC de la CPA, donde interaccionan con sus respectivas parejas CD154 y CD28, localizadas en el c-SMAC del linfocito T CD4.

La señalización del TCR, en conjunto con la interacción de CD28 con sus ligandos CD86/CD80 expresados en la CPA, induce en el linfocito T CD4: la secreción de IL-2, y la expresión transitoria de CD154, ICOS y CTLA-4 (CD152), este último expresado tardíamente en relación a los primeros ^{76, 98-104}. CD154 e ICOS participan en la activación, mientras que CTLA-4, que tiene los mismos ligandos que CD28, la regula negativamente.

La interacción CD154-CD40 expresados en el linfocito T CD4 y la CPA, respectivamente, eleva la expresión de CD80 y CD86 en la superficie de la CPA e induce la expresión de ICOSL, OX40L y 4-1BBL, proporcionando así ligandos de varias moléculas coestimuladoras para linfocito T CD4¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La interacción ICOSL-ICOS aumenta la expresión de CD154 en el linfocito T CD4 e induce la producción de citocinas como INF γ , IL-4, IL-5 e IL-10, favoreciendo su activación^{108, 109}.

A diferencia de ICOS, CTLA-4 regula negativamente la activación del linfocito T CD4. CTLA-4 se localiza tardíamente en el c-SMAC, en donde desplaza a CD28 de su interacción con CD80 y CD86, impidiendo que CD28 mantenga su efecto positivo en la activación¹¹⁰. Además, CTLA-4 activa la fosfatasa de tirosina Shp2,

19

que desfosforila y antagoniza los sustratos fosforilados por el entrecruzamiento del TCR, regulando negativamente su señalización^{111, 112}. Adicionalmente a CTLA-4, otro mecanismo de regulación negativa es la internalización y degradación del TCR (debido al reconocimiento del antígeno), lo que al parecer ocurre preferentemente en el c-SMAC. De esta manera, el SMAC participa en la regulación negativa de la activación⁷⁹.

En relación a los mecanismos que regulan la formación del SMAC (en el linfocito T CD4 y en la CPA); se ha descrito que ésta depende de la actividad del citoesqueleto, lo que se demostró al bloquear la formación del SMAC por el uso de inhibidores del rearreglo del citoesqueleto o de proteínas motoras^{75, 113-116}. Adicionalmente, en linfocitos T la participación del citoesqueleto se confirmó al demostrar que linfocitos T con mutaciones en proteínas que participan en la regulación del citoesqueleto de actina como: Vav (factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras), Cdc42, Rho (ambas son GTPasas pequeñas de la familia Rho) y WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) tienen alteraciones en la formación del SMAC ¹¹⁷⁻¹¹⁹. A la fecha se ha descrito que el rearreglo del citoesqueleto puede ser inducido en el linfocito T CD4 por la señalización de CD28, LFA-1 y CD2^{80, 81, 120, 121}; mientras que para la CPA no es claro las señales que lo originan.

La participación del citoesqueleto en la formación del SMAC puede ser a través de la redistribución de las moléculas presentes en la membrana plasmática, y/o transportando moléculas desde compartimientos intracelulares. Esto último se ha descrito en el linfocito T CD4, en donde el citoesqueleto participa en el transporte de vesículas intracelulares que contienen TCR, Lck y balsas lipídicas hacia el sitio de contacto con la CPA. Este transporte es inducido por el TCR y CD28, favoreciendo la activación, mientras que es inhibido por CTLA4; por lo que se ha propuesto podría funcionar como un mecanismo para regular la activación¹²²⁻¹²⁶. Por otro lado, en la CPA, particularmente en las células dendríticas, se ha descrito el transporte de las MHCII hacia el sitio de contacto con el linfocito T

CD4, lo que parece depender de la señalización a través de TLR, y de moléculas como LFA-1, CD2 y CD154^{69, 70}. De esta manera, el citoesqueleto participa en la formación del SMAC en el linfocito T CD4 y la CPA con la que interactúa, resultando en la activación de ambas células.

Es importante mencionar que el resultado de la sinapsis inmunológica depende de las moléculas presentes y de la eficiencia de su señalización. Ésta última, para algunas moléculas, es mejorada cuando ocurre en regiones insolubles de la membrana plasmática, denominados en conjunto dominios lipídicos¹²⁷. Dentro de estos dominios se encuentran las balsas lipídicas, las cuales se ha descrito se acumulan en el c-SMAC^{123, 128}, en donde se ha propuesto mejoran la señalización de los receptores ahí localizados.



Sinapsis Inmunológica A) Esquema de las interacciones moleculares entre el linfocito T CD4 y la CPA, con flechas se indica la señalización del receptor. B) Vista desde arriba de la estructura del SMAC durante la etapa de activación. Esquema basado en Nature Rew Vol.3, 2003.

2.1.- Balsas Lipídicas y sinapsis inmunológica

Las balsas lipídicas o rafts son un tipo de dominio lipídico¹²⁹. Estos dominios son regiones insolubles de la membrana plasmática que se detectan por el tratamiento de la célula con detergentes no iónicos como Triton X-100. Los dominios lipídicos están constituídos por: esfingolípidos, ácidos grasos saturados, proteínas asociadas a glucosil-fosfatidil-inositol (GPI), colesterol, y en la parte citosólica están enriquecidas en proteínas aciladas con ácidos grasos saturados (miristiladas o palmitoiladas), que incluyen cinasas de la familia Src (Lck) o GTPasas pequeñas (Ras)¹³⁰⁻¹³³. Debido a su composición hidrofóbica, los dominios lipídicos forman una fase ordenada y se mantienen como entidades independientes; rodeadas del resto de los constituyentes de la membrana plasmática, que forman la fase desordenada¹³⁴⁻¹³⁶.

Existen diferentes tipos de dominios lipídicos, como las caveolas, las balsas lipídicas clásicas o rafts, y las balsas lipídicas no clásicas^{129, 134}. Las caveolas se caracterizan por la presencia de caveolina y participan en endocitosis y transducción de señales. Las balsas lipídicas clásicas tienen un alto contenido en gangliósido GM1 (el cual se utiliza como un marcador de ellas), son dependientes de colesterol, y participan principalmente en la transducción de señales. Mientras que las balsas lipídicas no clásicas están enriquecidas en proteínas preniladas o en proteínas de la familia de las tetraspaninas, y son menos dependientes del colesterol que las balsas lipídicas clásicas clásicas^{134, 137-140}.

Se ha demostrado que las balsas lipídicas clásicas participan en la transducción de señales al disminuir el umbral de activación de varios receptores, lo cual es debido a la concentración en ellas de cinasas y proteínas citosólicas necesarias para la señalización del receptor^{122, 127, 141-143}. Dentro de los receptores del sistema inmunológico que señalizan en balsas lipídicas encontramos a: el TCR, el BCR, MHCII, FcɛRI, CD28, CD2, CD14, CD19/CD21, CD40, CD45, CD48, CD58, CTLA-4 y PD1^{142, 144-146}. Algunos de estos receptores están asociados a GPI (CD14, CD58 y CD48), mientras que otros son moléculas

transmembranales, que pueden estar asociadas a colesterol y esfingolípidos, formando balsas lipídicas elementales. Éstas son estructuras de 25-70 nm de diámetro, que se encuentran en células en reposo, y se ha propuesto que facilitan (debido a su contenido en colesterol y esfingolípidos) la translocación del receptor a las balsas lipídicas^{127, 135}.

A la fecha el modelo más aceptado para la translocación transitoria del receptor a balsas lipídicas, sugiere que ésta se debe al entrecruzamiento del receptor por su ligando, induciendo la agregación de las balsas lipídicas elementales, lo que origina grandes balsas lipídicas, con un tamaño entre 100-1000 nm, estables y asociadas al citoesqueleto^{122, 127}



Modelo para el papel de las balsas lipídicas en la señalización de receptores La interacción del ligando con su receptor localizado en las balsas lipídicas elementales, induce la agregación de estos, formando balsas lipídicas de mayor tamaño. Esquema basado en Annu. Rev. Immunol 2003. 21: 457-81.

La importancia de las balsas lipídicas en la señalización intracelular ha sido ampliamente estudiada en linfocitos T CD4, los que presentaron una disminuída capacidad de activación a través del TCR después del tratamiento con fármacos que inestabilizan las balsas lipídicas clásicas, (metil-β-ciclodextrina, nistatina y filipina)^{147, 148}. Sin embargo, estos resultados no fueron concluyentes debido a que estos fármacos afectan otras funciones celulares, tal es el caso de la metil-β-

ciclodextrina, la cual altera la morfología celular, la señalización intracelular (inhibe la activación de la fosfolipasa C) y varias funciones celulares como exocitosis¹⁴⁹. Posteriormente, se encontró que los linfocitos T de ratones deficientes de esfingomielinasa, cuyas balsas lipídicas son inestables, tienen alteraciones en su activación, apoyando la función de las balsas lipídicas en la activación de linfocitos T¹⁵⁰.

Adicionalmente a la eficiencia de la señalización del TCR en balsas lipídicas, la activación del linfocito T CD4 es mejorada por la localización de las MHCII (su ligando) en ellas^{137, 151}. En linfocitos B y células dendríticas maduras se han encontrado a las MHCII en dos tipos de balsas lipídicas elementales: unas clásicas, enriquecidas en el gangliósido GM1 y dependientes de colesterol, y las otras no clásicas, enriquecidas en proteínas de la familia de las tetraspaninas (CD81, CD82), CD86 y HLA-DM, e independientes de colesterol. Ambos tipos de balsas disminuyen el umbral de activación del linfocito T CD4, siendo relevante en condiciones limitantes de antígeno^{137, 151}. Adicionalmente se ha descrito que la inclusión de las MHCII en balsas lipídicas clásicas podría favorecer la generación de una respuesta inmune de tipo Th1^{151, 152}.

Considerando que la localización de las MHCII en balsa lipídicas elementales disminuye el umbral de activación del linfocito T CD4; se ha sugerido que la CPA podría participar activamente en la sinapsis inmunológica, al preformar en su membrana plasmática balsas lipídicas enriquecidas en MHCII y/o moléculas relevantes en la presentación de antígeno como CD86 y CD40. Con respecto a la localización en la membrana plasmática de estas moleculas, se ha encontrado que en linfocitos B en reposo, CD86 es excluída de las balsas lipídicas, mientras que CD40 es redistribuída a ellas después de su entrecruzamiento o el de las MHCII ^{90, 96, 153, 154}. En células dendríticas maduras las MHCII colocalizan con CD40 en regiones insolubles de la membrana plasmática, mientras que CD86 se redistribuye a ellas sólo después de la ligación de las MHCII o de CD40^{155, 156}. Estos estudios sugieren que en condiciones basales, las MHCII se localizan en

balsas lipídicas elementales, mientras que CD40 y CD86 se redistribuyen a ellas después de señales de activación, como la inducida por MHCII.

Las MHCII inducen señales que varían dependiendo de si se localizan en balsas lipídicas elementales o fuera de ellas. A la fecha se desconoce las consecuencias de estas diferentes señalizaciones, solo se ha descrito que la señalización generada en balsas lipídicas favorece el reclutamiento de un mayor número de MHCII a ellas¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, lo cual tentativamente podría mejorar su función como CPA. Sin embargo, aún faltan estudios que permitan establecer la relevancia en la sinapsis inmunológica de la distribución de moléculas en la CPA y los mecanismos que lo regulan.

Finalmente, si la CPA proporciona al linfocito T CD4 las señales accesorias o coestimuladoras, éste se activará y a su vez proporcionará señales a la CPA que le permitirán realizar su función particular. En el caso del linfocito B, su función como CPA le permite obtener la cooperación del linfocito T CD4 en una respuesta frente a antígenos timo-dependientes. Adicionalmente la función del linfocito B como CPA puede ser importante en iniciar la activación de linfocitos T CD4 en una respuesta secundaria. Considerando su importancia varios grupos de investigación incluyendo el nuestro, se ha enfocado a estudiar el papel linfocito B como CPA *in vivo* y los estímulos que regulan esta función.

3 Linfocitos B como CPA

El papel del linfocito B como CPA se ha estudiado extensamente. Algunos autores sostienen que los linfocitos B son incapaces de activar linfocitos T CD4 vírgenes^{160, 161}. Esto lo atribuyen principalmente a la baja expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos B vírgenes, lo cual es ineficiente para activar linfocitos T CD4 e inducir en ellos la expresión en su superficie de CD154¹⁶². La ausencia de la interacción CD154-CD40 impide al linfocito B aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86/CD80 necesarias para activar al linfocito T CD4, creándose un círculo vicioso. De forma tal que la

activación de linfocitos T vírgenes por linfocitos B vírgenes es difícil, debido a la necesidad de coestimulación de ambos.

Otros estudios han demostrado que los linfocitos B juegan un papel importante como CPA, y que son capaces de inducir proliferación a linfocitos T vírgenes cuando presentan antígenos que reconocieron a través del BCR^{163, 164}. Esto sea atribuído a que la señalización a través del BCR induce un aumento transitorio en la expresión de ligandos coestimuladores del linfocito T CD4, especialmente de CD86; además de promover la presentación de péptidos antígeno específicos. Esto último se debe a dos moléculas expresadas exclusivamente en el linfocito B: el BCR y DO^{165, 166}. La primera induce señales de activación al linfocito B, además de que sirve para capturar y concentrar el antígeno en el *MIIC*. Mientras que la segunda actúa como un regulador negativo de DM (DM, favorece la formación de complejos MHCII-péptido de alta afinidad)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. La actividad de DM es inhibida por su asociación con DO; asociación que se pierde debido a la dismunición en el pH, como ocurre en el *MIIC*¹⁷⁰⁻¹⁷². De esta manera, la actividad de DM es favorecida en el *MIIC*, en donde abundan los péptidos derivados del antígeno especifico del linfocito B.

Adicionalmente al BCR la eficiencia del linfocito B como CPA es mejorada por la estimulación a través de receptores tipo Toll y CD40, siendo esta última la de interés en esta tesis, por lo que describiremos algunas de sus características generales y posteriormente su papel en la función de las CPA, particularmente en el linfocito B.

4 CD40-CD154

4.1 Estructura

CD40 es una glicoproteína transmembranal tipo I que pertenece a la familia del TNFr. La molécula CD40 murina tiene un PM entre 45-50 kDa, y está integrada por 305 aminoácidos de los cuales 90 se localizan en la región citoplásmica, 22 en la transmembranal y 193 en la extracelular. Como otros miembros de la familia del TNFr la región extracelular de CD40 tiene cuatro dominios ricos en cisteínas (DRC), que son pseudorrepeticiones de 40 aminoácidos con seis cisteínas que generan tres enlaces disulfuro^{4, 173}.

Además de esta forma transmembranal de CD40 (tipo I), existen cuatro isoformas que se originan por empalme alternativo de su RNAm; dos solubles (isoformas II y V) y dos transmembranales (isoformas III y IV). Adicionalmente a las dos formas solubles, una tercera puede generarse por la actividad de metaloproteinasas sobre la isoforma tipo I de CD40. Todas las isoformas interactúan con CD154, aunque que sólo la isoforma transmembranal tipo I, es capaz de generar señalización intracelular; mientras que las otras son señuelos que actúan como dominantes negativas que regulan la señalización que la célula recibe a través de CD40^{174, 175}.

4.2 Expresión de CD40

La expresión de CD40 (isoforma I) se describió inicialmente en linfomas B y después se encontró en células dendríticas y macrófagos. Posteriormente se detectó su expresión en otras células que no son CPA, como: linfocitos T CD8 activados, basófilos, eosinófilos, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos y algunos carcinomas¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Aunque son muchas las células que expresan CD40, donde más se ha estudiado su función es en la CPA.

4.3 Señalización a través de CD40

La señalización de CD40 se origina por la interacción con su ligando, CD154, que es una glicoproteína transmembranal homotrimérica tipo II, codificada en el cromosoma X (humano y murino). CD154 se expresa predominantemente en linfocitos T CD4 activados, en los cuales es inducida por la señalización del TCR, y regulada positivamente por señales derivadas de CD28, CD2, ICOS, e IL-12, mientras que es inhibida por la IL-4¹⁸⁰⁻¹⁸³.

Aunque es claro que la interacción CD40-CD154 es necesaria para iniciar la señalización de CD40, se desconoce si esto es consecuencia de su trimerización en la membrana plasmática o de un cambio conformacional de trímeros ya preexistentes en ella. Esta última posibilidad ha sido demostrada en dos miembros de la familia del TNFr; Fas y TNFr, los que preexisten en la membrana plasmática como trímeros y cuya interacción con sus ligandos modifica su conformación, exponiendo los sitios de unión a proteínas que participan en su señalización^{184, 185}.

CD40, al igual que otros miembros de la familia del TNFr, no tiene actividad enzimática, y su señalización la realiza a través de la interacción de su región citoplásmica con proteínas adaptadoras de la familia TRAF (Factor asociado a TNFr)^{179,186}. Hasta la fecha se ha encontrado la asociación a CD40 de TRAF-2, TRAF-3, TRAF-5 y TRAF-6, las cuales median efectos diferentes de CD40. Así por ejemplo: TRAF-2 induce expresión ICAM-1, mientras que TRAF-6 parece ser importante en la producción de IL-6, en la maduración de la afinidad y en la inducción de la expresión de CD80 en la superficie¹⁸⁷⁻¹⁹².

Adicionalmente a la participación de proteínas de la familia de TRAF, en el linfocito B, la señalización de CD40 involucra la activación de cinasas de tirosina (PTK), incluyendo Syk y Lyn, cinasas de serina treonina como SAPK y JNK, p38 (protein-cinasa activada por mitógenos) y PI3K. Estas vías de señalización activan factores de transcripción como NFκB y NF-AT, que inducen e inhiben genes, originando los diferentes efectos de CD40 en el linfocito B ^{107, 193-196}.

4.4 Importancia de la interacción CD154-CD40

La importancia de la interacción de CD40-CD154 se demostró inicialmente en pacientes con síndrome hiper-IgM, que es una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X debida a mutaciones en el gen de CD154. Los pacientes con este síndrome se caracterizan por niveles elevados o normales de IgM y disminuidos de otras inmunoglobulinas, por lo que su respuesta humoral es ineficiente¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

Adicionalmente, estos pacientes cursan con enfermedades recurrentes de vías respiratorias e infecciones por patógenos oportunistas como *Cryptosporidium sp* (diarreas) y *Pneumocystis carinni* (neumonia), que normalmente son controladas por linfocitos T²⁰⁰⁻²⁰². Así, en los pacientes con síndrome hiper-IgM, tanto la respuesta inmune humoral como la celular están afectadas. Un fenotipo similar presentan los ratones deficientes de CD40 o de CD154²⁰³⁻²⁰⁵, confirmando la importancia de la interacción CD154-CD40 en la respuesta inmune.

Los efectos de la interacción de CD154-CD40 dependen de la célula que exprese CD40, de su estadio de maduración y activación^{206, 207}. En las distintas CPA los efectos principales son los siguientes:

4.4.1 Células dendríticas

La ligación de CD40 en estas células induce su maduración final, que se detecta por aumento en la expresión en superficie de MHCI, MHCII, CD80, CD86, CD54 (ICAM-1), CD72 (CD27L), OX40L, 41BB-L y CD40^{176, 208}, además de inducir la producción de TNF e IL-12²⁰⁹. Estos cambios, convierten a la célula dendrítica en una CPA eficiente, capaz de inducir la activación de linfocitos T CD4 vírgenes, y la preparan o le dan "licencia" para activar linfocitos T CD8 antígeno específicos²¹⁰⁻²¹².

Las deficiencias en la maduración de células dendríticas, como ocurre en ausencia de la señalización a través de CD40, resultan en una activación deficiente de linfocitos T, y consecuentemente una respuesta inmune celular disminuída; lo que explica en parte la elevada incidencia de infecciones por patógenos intracelulares y la respuesta disminuida de linfocitos T frente a antígenos proteicos.

4.4.2 Monocitos/macrófagos

En estas células la interacción CD154-CD40 previene la apoptosis, induce la expresión en superficie de CD80, CD86, CD40 y CD54, así como la producción

de TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFNγ y oxido nítrico²¹³⁻²¹⁶. Estos cambios aumentan la capacidad microbicida del macrófago; por lo que el ratón deficiente de CD40 es incapaz de resolver infecciones intracelulares como la leishmaniasis, en donde la respuesta inmune Th1 y el macrófago juegan un papel importante para su eliminación²¹⁷⁻²¹⁹.

4.4.3 Linfocitos B

Los efectos de la interacción CD154-CD40 en linfocitos B depende de su estadio de maduración, la duración de esta interacción y de la presencia de señales adicionales (citocinas o reconocimiento del antígeno)^{207, 220-222}.

Los principales efectos que induce la estimulación a través de CD40 en linfocitos B maduros son:

a) Proliferación

b) Generación de centros germinales, células plásmaticas y linfocitos B de memoria.

c) Producción de anticuerpos y cambio de isotipo.

d) Expresión de moléculas accesorias y producción de citocinas.

A continuación describiremos en forma breve cada uno de estos efectos:

<u>a) Proliferación:</u> En los diferentes modelos utilizados para estudiar el efecto de la interacción CD154-CD40 en linfocitos B (fibroblastos transfectados con CD154, CD154 recombinante o anticuerpos anti-CD40), se ha demostrado que ésta induce síntesis de DNA y proliferación celular de linfocitos B maduros vírgenes y de memoria, especialmente cuando hay entrecruzamiento del BCR y en presencia de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10²²³⁻²²⁶.

b) Generación de centros germinales y linfocitos B de memoria. La importancia de la interacción CD154-CD40 en la formación y mantenimiento de los centros germinales se demostró en ratones deficientes de CD40 o de CD154 en los

cuales no se formaban centros germinales después de la inmunización con un antígeno proteico^{205, 227, 228}. Concordante con lo anterior, en los pacientes con síndrome hiper-IgM no hay centros germinales²²⁹.

Los centros germinales son los sitios en donde, en presencia de linfocitos T CD4 específicos contra el mismo antígeno, ocurre la hipermutación somática (HMS), la selección de los linfocitos B con un BCR con alta afinidad por el antígeno, la diferenciación a linfocitos B de memoria o células plasmáticas, y el cambio de isotipo. La HMS es un evento aleatorio en el que ocurren mutaciones puntuales en la región variable de la inmunoglobulina, las que pueden conducir a un aumento o disminución en la afinidad por el antígeno, o bien a un cambio de la especificidad. Los linfocitos B que después de la HMS aún reconocen el antígeno a través del BCR, y que además reciben la señalización de CD40 (esta última por el linfocito T), son rescatados de la apoptosis, y continúan su proceso de diferenciación ya sea hacia células plasmáticas o linfocitos B de memoria ²³⁰.

Hasta la fecha no está claro cual es el papel de CD40 en la diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática o linfocitos B de memoria, se ha demostrado que en ambos casos se requiere de la señalización de CD40. Al parecer la diferenciación hacia una u otra vía depende del estadio del linfocito B (virgen o de memoria), la duración de la interacción CD40-CD154 y de presencia de señales adicionales (citocinas). Así, se ha sugerido que una interacción de CD40-CD154 de corta duración (menor a 4 días) favorece la generación de células plasmáticas a partir de linfocitos B de memoria, mientras que se requiere que esta interacción sea prolongada (mayor a 7 días) para la generación de células plasmáticas a partir de linfocitos B vírgenes^{181, 207, 231}.

<u>c) Producción de anticuerpos y cambio de isotipo</u>: El cambio de isotipo es la capacidad del linfocito B para producir anticuerpos distintos de IgM después del estímulo inicial. A nivel molecular, el cambio de isotipo consiste en la asociación de los segmentos previamente rearreglados de la región variable VDJ con un

nuevo segmento de la región constante; lo que permite al linfocito B expresar anticuerpos con la misma especificidad pero distinto isotipo o clase, y por lo tanto con diferente función biológica. Como ya se mencionó, en pacientes con el síndrome hiper-IgM prácticamente no hay inmunglobulinas de otro isotipo que no sea IgM, confirmando la importancia de la interacción CD154-CD40 en el cambio de isotipo.

Adicionalmente a la interacción CD40-CD154, las citocinas participan en el cambio de isotipo determinando la clase de anticuerpos resultante de éste^{223, 232}. Así en el ratón: la IL-4 e IL-13 son necesarias para la producción de IgG1 e IgE; el INF γ para IgG2a e IgG3; el TGF- β + IL-10 para IgA; e IL-21 para IgG-2b. En el humano: IL-10 participa en la producción de IgG1 e IgG3; IL-4 para IgG4 e IgE; IL-21 para IgG1 e IgG3; y TGF- β para IgA^{225, 233-241}.

d) Expresión de moléculas accesorias y producción de citocinas. Al igual que en otras CPA, la interacción CD154-CD40 induce expresión de: MHCII, CD54 (ICAM-1), LFA-1 (CD11a/CD18), CD44H, VLA-4, CD80, CD86, ICOSL, OX40L, 4-1BBL, CD23, Fas^{107, 180, 242-249}, así como la producción de IL-6, IL-10, TNF y linfotoxina- α^{179} . Varias de estas moléculas aumentan la capacidad del linfocito B como CPA. De hecho, la ligación de CD40 es particularmente importante para la función del linfocito B como CPA, lo que se ha demostrado en los linfocitos B de ratones deficientes en CD40, los cuales tienen más comprometida su función como CPA que la de las células dendríticas del mismo ratón²⁵⁰.

5 CD40 y la función del linfocito B como CPA

Los estudios dirigidos a determinar los cambios inducidos por CD40 que aumentan la función del linfocito B como CPA sugieren, que esto es debido a cambios relacionados a la expresión de moléculas accesorias en la superficie y/o al procesamiento de antígeno ^{247, 248, 251}.

Con respecto a las moléculas accesorias, como previamente comentamos, la señalización a través de CD40 aumenta y/o mantiene la expresión en superficie de moléculas como MHCII, ICAM-1, CD80, CD86, ICOSL, OX40L y CD44H. Estas moléculas pueden optimizar la función del linfocito B como CPA, al fortalecer la interacción entre el linfocito T CD4 y el linfocito B por medio de las moléculas de adhesión (ICAM-1 y CD44H); y/o al proporcionar los ligandos de moléculas coestimuladoras para el linfocito T CD4 como CD80 y CD86, que son los ligandos de CD28, la molécula coestimuladora más importante para el linfocito T CD4 virgen^{220, 247, 252}.

La importancia de la expresión de CD80 (inducida por la ligación de CD40) en la función del linfocito B como CPA se demostró en cultivos mixtos de linfocitos; en los cuales el estímulo a través de CD40 por 48 horas aumentó la expresión de CD80 en su superficie, la cual duplicó la eficiencia del linfocito B como CPA²⁴⁸. En la actualidad existe controversia sobre la función de CD80 *in vivo* ya que por su cinética de expresión y su mayor afinidad por CTLA-4, parece ser su ligando preferencial; por lo que participaría más en la regulación negativa del linfocito T, que en su activación ^{101, 112}. Sin embargo, mientras CTLA-4 no se exprese en el linfocito T CD4, CD80 sigue siendo el ligando de CD28.

Por otro lado, y en forma adicional al aumento de moléculas en superficie, se ha sugerido que el aumento en la eficiencia del linfocito B como CPA se debe a modificaciones en el procesamiento de antígeno²⁵³. Esto se deriva de estudios en los cuales los linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-CD40, son más eficiencientes como CPA solo en presencia del antígeno completo, y no así cuando se administra el péptido sintético (no requiere procesamiento para ser presentado). Estos resultados sugieren que el estímulo a través de CD40 modifica el procesamiento de antígeno en el linfocito B, aumentando su eficiencia como CPA.

Hasta la fecha se desconocen las modificaciones al procesamiento de antígeno inducidas por la señalización de CD40. Se ha descrito que la estimulación de linfocitos B a través de CD40 induce la expresión de Rab7²⁵⁴ (que es una GTPasa pequeña que participa en el transporte de endosomas tardíos a lisosomas) y la activación de PI3K¹⁰⁷ (cinasa relacionada con el tráfico de compartimientos de la vía endocítica). Teóricamente, Rab-7 y PI3K podrían modificar algún paso en el procesamiento de antígeno que dependa de cambios a la vía endocítica; similar al que ocurre para el BCR, el cual induce la fusión de compartimientos de la vía endocítica mediante la activación de PI3K²⁵⁵. Actualmente, se desconoce si la sobreexpresión de Rab7 y/o la activación de PI3K, inducidas por la señalización a través de CD40, modifican la función del linfocito B como CPA.

Alternativamente a modificaciones en el procesamiento de antígeno y/o en la expresión de moléculas en superficie, el estímulo de linfocitos B humanos a través de CD40 o MHCII, induce la asociación y localización de ambas moléculas en regiones insolubles de la membrana plasmática^{154, 256}. Considerando que la presencia de MHCII en balsas lipídicas elementales mejora la función del linfocito B como CPA¹⁵¹, es factible proponer que la activación de linfocitos B a través de CD40 podría mejorar su función como CPA debido a un cambio en la distribución de moléculas MHCII y/o CD40 en la membrana plasmática.

Finalmente y de acuerdo a lo anterior podemos concluir que aunque la función del linfocito B como CPA es mejorada por la estimulación a través de CD40, aún faltan estudios que esclarezcan los cambios moleculares responsables de ello.

Justificación

Los linfocitos B, al igual que las células dendríticas y los macrófagos, son CPA que participan en la activación de linfocitos T CD4. Adicionalmente, la función de los linfocitos B como CPA es indipensable para obtener la cooperación de linfocitos T específicos contra el mismo antígeno, y generar una respuesta inmune humoral eficiente. Ésta se caracteriza por la producción de anticuerpos con alta afinidad por el antígeno y cambio de isotipo y la generación de linfocitos B de memoria. Debido a que la eficiencia del linfocito B como CPA repercute en la calidad de la respuesta humoral, es importante estudiar los estímulos que mejoran esta función; de los cuales el estímulo a través de CD40 es el principal. Aunque está demostrado que la ligación de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA, los cambios moleculares responsables de ello no han sido estudiados en detalle; por lo que su estudio permitirá entender mejor los cambios moleculares que afectan la función del linfocito B como CPA.
Planteamiento del problema

¿Cuáles son los cambios moleculares inducidos por CD40 que aumentan la eficiencia del linfocito B como CPA?

Hipótesis

1. La activación de linfocitos B a través de CD40 aumenta la eficiencia de presentación de antígenos, en forma no excluyente, por cualquiera de los siguientes mecanismos:

a) Modificación del procesamiento de antígeno

b) Aumento en la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras en la superficie celular.

c) Redistribución de MHCII en la superficie celular con o sin moléculas coestimuladoras.

Objetivos

Objetivo general

Determinar cuales son los cambios moleculares inducidos a través de CD40 que mejoran la función del linfocito B como CPA.

Objetivos particulares

a) Estudiar si el estímulo a través de CD40 induce modificaciones en el procesamiento de antígeno, que mejoren la capacidad del linfocito B para presentar péptidos a linfocitos T CD4 específicos.

b) Analizar si la estimulación de linfocitos B a través de CD40 induce cambios en la expresión en superficie de moléculas relacionadas con la presentación de antígeno, y si esto se relaciona con una mejor función del linfocito B como CPA.

c) Estudiar si la activación a través de CD40 induce una redistribución de moléculas MHCII a balsas lipídicas, y si esto influye en la eficiencia del linfocito B como CPA.

d) Estudiar si la ligación de CD40 induce la redistribución de moléculas relacionadas en la presentación de antígeno, como CD80, generando en el linfocito B una estructura molecular similar al c-SMAC, lo cual facilitaría la activación del linfocito T CD4.

Materiales y Métodos

Reactivos

El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 10 mM piruvato de sodio, 10 mM aminoácidos esenciales, 25 mM HEPES (Hy-clone, Salt Lakey) y 10 µg/mL ciprofloxacina (Bayer). La lisozima de gallina (LG), RNAasa A bovina (RNAasa A) y la metil-β ciclodextrina fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). La wortmanina y staurosporina se adquirieron de Calbiochem (San Diego, CA), y la ³H-timidina (³H-TdR) se compró a Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Los péptidos de LG y de RNAasa A se sintetizaron en Hartwell Center St. Jude Children´s Research Hospital o se compraron en Research Genetics (Hunstville, AL), respectivamente. Los kits para marcar proteínas con biotina y Rojo Texas fueron de Pierce Chemical Co, (Rockford, IL), y el de Alexa-488 de Molecular Probes.

Anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos utilizados en este trabajo reconocen moléculas murinas. Los anticuerpos anti-MHCII IAα^k (IgG2b)²⁵⁷, fueron producidos en nuestro laboratorio en cultivos del hibridoma murino H116.32 (donado por el Dr. Gûnter Hämmerling, DKFZ, Heidelberg, Alemania). Los anticuerpos anti-CD40 (IgG2a)²⁵⁸ fueron producidos por el hibridoma de rata 1C10 que fue donado por el Dr. Andy Heath (Sheffield, UK). Los anticuerpos anti-CD11b (IgG2b), anti-CD86 (IgG2a) y anti-CD80 (IgG2a), fueron producidos por los hibridomas de rata; 70.15.11.5, GL-1 y 1G10, respectivamente, adquiridos de la American Type Culture Collection (ATTC). Todos los anticuerpos fueron producidos en cultivos celulares, y se purificaron en columnas de sepharosa-proteína G o proteína A (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La concentración y la funcionalidad de los anticuerpos se determinaron por espectrofotometría a 280 nm y citometría de flujo, respectivamente.

Los anticuerpos anti-MHC II y anti-CD80, y la lisozima de gallina se marcaron con biotina, rojo Texas y Alexa-488, respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, los anticuerpos anti-CD54-biotina (clona 3E2) o anti-CD80-FITC (clona 1G10) se compraron en PharMingen y la subunidad B de la toxina del cólera-Alexa 488 en Molecular Probes.

Líneas celulares

Como CPA se utilizaron las líneas celulares LK-35.2 (H-2^{k,d})²⁵⁹ y dos líneas derivada de ella, LK-LG-KDEL y LK-LG, que fueron donadas por Frank Momburg (Heidelberg)²⁶⁰. LK-35.2 es un hibridoma de una sublinea de A20 (derivada de ratones Balb/c H2^d) con esplenocitos de ratones B10.BR H-2^k. Las líneas LK-LG-KDEL y LK-LG se generaron por la transfección de células LK-35.2 con plásmidos que contiene el cDNA que codifica para una forma de LG a la cual se le insertó una señal de retención en el retículo endoplásmico (KDEL)²⁶¹, o que codifican para una forma soluble de LG; originando células que expresan la LG como proteína residente del RE (LK-LG-KDEL)²⁶², o que la secretan (LK-LG). Las tres líneas, LK-35.2, LK-LG-KDEL y LK-LG, expresan cantidades semejantes de MHCII, CD40, CD80 y CD86 en superficie. Adicionalmente a estas líneas celulares, se utilizaron células LKK (derivadas de células L), que previamente habían sido transfectadas con los genes que codifican para las MHCII IA^k.

Los hibridomas de linfocitos T CD4 que reconocen péptidos de LG fueron; C10, A6B3, E907.D, 2B6.3, 4G4.1y 2G7 que reconocen los determinantes 48-62, 34-45, 33-47, 24-43, 48-62 y 1-18 de la LG, respectivamente²⁶³⁻²⁶⁵. Los dos primeros hibridomas fueron donados por la Dra. Laurie Glimcher (Universidad de Harvard), el tercero fue generado por el Dr. José Moreno (UIM en Enfermedades Autoinmunes) y el cuarto fue donado por el Dr. Luciano Adorini (Roche Milan). El hibridoma específico para RNAasa A bovina fue TS12 que reconoce el determinante 43-56 de esta proteína, y fue donado por el Dr. Paul Allen²⁶⁶. La línea celular dependiente de IL-2, utilizada en los estudios de presentación de antígeno, fue CTLL-2, la cual se adquirió del ATCC. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI suplementado, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 90 % de humedad, en botellas de cultivo de 200, 125 y 75 cm², a 37 °C.

Células	Características
LK-35.2	CPA MHCII (H-2 ^{k,d})
LK-LG-KDEL	CPA MHCII (H-2 ^{k,d}), y expresa LG con señal de retención en RE
LK-LG	CPA MHCII (H-2 ^{k,d}), y expresa LG soluble
LKK	Células L (LTK-) transfectadas con MHCII (H-2 ^k)
C10	Hibridoma T CD4, LG 48-62 (IA ^k)
E907.D	Hibridoma T CD4, LG 33-47 (IA ^k)
A6B3	Hibridoma T CD4, LG 34-45 (IA ^k)
2B6.3	Hibridoma T CD4, LG 25-43 (IA ^k)
4G4	Hibridoma T CD4, LG 48-62 (IA ^k)
2G7	Hibridoma T CD4, LG 1-18 (IE ^k)
TS12	Hibridoma T CD4, RNAasa A bovina 43-56 (IA ^k)

Ratones

Se utilizaron ratones C3H/HeJ y 3A9 de 8-12 semanas de edad, de ambos sexos. Los segundos son transgénicos para los genes de las cadenas αβ del TCR del hibridoma con el mismo nombre (3A9) que reconoce el péptido 48-62 de la LG asociado a la MHCII IA^{k 267}. Mientras que los primeros expresan MHCII IA^k y sus CPA son capaces de unir y presentar los péptidos de LG a los hibridomas de linfocitos T CD4 y a los linfocitos T de ratones 3A9.

Obtención de esplenocitos

Se sacrificaron los ratones por luxación cervical, se extrajo el bazo y se colocó en una caja petri con 5 mL de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) fría. El bazo se cortó longitudinalmente y se colocó entre las partes esmeriladas de dos portaobjetos. Los esplenocitos se extrajeron mediante movimientos circulares de los portaobjetos, adicionando medio RPMI-1640 sin suplementar. La suspensión resultante se transfirió a tubos Eppendorff, que se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en PBS-2% SFB (PBS-SFB), y se centrifugó a 1200 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de solución de lisis de eritrocitos (0.15 M NH4Cl; 1mM KHCO₃ y 0.1mM Na₂EDTA),

incubando 4 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, los esplenocitos fueron resuspendidos en solución de FACS (PBS-2% SFB 1% suero de conejo) para los del ratón 3A9, y en medio completo los del C3H/HeJ. En ambos casos, las células se contaron en una cámara de Neubauer con azultripano (que tiñe de azul las células muertas) para excluir del conteo a las células muertas.

Purificación de Linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4 del ratón 3A9 se purificaron por selección negativa en citometría flujo (FACS) después de teñir con anticuerpos anti-B220, CD8, IA^k, NK1.1, CD69 y CD14 marcados con ficoeritrina (PE, Pharmingen, San Diego, CA) en un citómetro Mo-Flo (Cytomation, Fort Collins, CO). Brevemente, los esplenocitos resuspendidos en la solución de FACS se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y el botón celular resuspendido en una solución de FACS adicionada con los anticuerpos anti-B220, CD8, NK1.1, CD69 y CD14 marcados con ficoeritrina, los cuales se incubaron 30 minutos en hielo. Al término de la incubación, las células se lavaron tres veces con 1.5 mL de la solución de FACS y se resuspendieron en PBS. Las células transfirieron a tubos de FACS, se analizaron en un citómetro Mo-Flo y se recolectaron las células no teñidas, que corresponden a la población de linfocitos T CD4, cuya pureza fue del 90%.

Purificación de linfocitos B

La purificación de linfocitos B se realizó por selección negativa en el método de "panning" en cajas petri bacteriológicas recubiertas con anticuerpos anti-CD4, anti-Thy 1.2 y anti-CD11b. Estas cajas se prepararon incubando durante la noche a 4°C con 10 mL de una solución de TRIS 0.5 M pH 9.3 que contenía 10 µg de cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-Thy 1.2, anti-CD4 y anti-CD11b. Después de la incubación, las placas se lavaron 2 veces con PBS y una vez más con PBS y albúmina bovina al 1% para después adicionar la suspensión de esplenocitos.

Para la purificación de linfocitos B, se adicionaron 10 mL de la suspensión de esplenocitos del ratón C3H/HeJ (2x10⁶ células/mL) a las cajas petri previamente recubiertas con anticuerpos y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Al término, la suspensión celular se recuperó y se transfirió a otra caja petri idéntica, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente. Después de ello la suspensión celular se transfirió a tubos de 50 mL y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el botón celular fue resuspendido en RPMI-1640 suplementado. Para determinar la eficiencia de purificación, se tiño una alícuota de la suspensión celular final con anticuerpos anti-CD19, siendo 88% la población CD19 positiva.

Estimulación a través de CD40

El efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 se realizó adicionando anticuerpos anti-CD40 (agonistas) o anti-CD11b (control de isotipo) a una concentración de 10 μg/mL. En otros experimentos se cultivaron 2.5x10⁵ células LK35.2 o 2x10⁶ linfocitos B de bazo en placas de 6 pozos, a las cuales se añadió 2 mL RPMI-1640 suplementado. En estos casos, la estimulación a través de CD40 se realizó con una solución de RPMI-1640 suplementado que contenía los anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b a una concentración de 10 μg/mL.

En los experimentos con inhibidores, estos se adicionaron 10 minutos antes de los anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b, manteniéndose durante el tiempo de estimulación; con excepción metil- β -ciclodextrina (m- β C) la cual se adicionó 10 minutos antes de finalizar la estimulación. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.1% de azida de Na, 20nM de staurosporina, 1 μ M de wortmanina, 4 μ M de citocalasina D y 10mM m- β C.

Después de la estimulación con anti-CD40, las células se cosecharon, se lavaron extensamente con PBS frío, centrifugando siempre a 4°C para evitar cambios ulteriores. Las células obtenidas se utilizaron para estudios de endocitosis, citometría de flujo o se fijaron con paraformaldehído y se utilizaron en estudios presentación de antígeno o de desregulación del TCR.

Endocitosis de LG-Alexa-488

Para estos estudios se utilizaron células LK35.2 cultivadas por 24 horas en presencia 10 µg/mL de los anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b (como se mencionó en el apartado anterior) o en ausencia de estos. Tres horas antes de finalizar el cultivo, las células se cosecharon y contaron en una cámara de Neubauer. Se transfirieron 2x10⁵ células de cada condición a tubos eppendorff, se centrifugaron 3 minutos a 1200 rpm a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µL con 2 mg/mL de LG-Alexa-488 y 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b. Se incubaron 3 horas a 37 °C, acompletando 24 horas en presencia de anti-CD40 o solamente 3 horas en presencia de éste, después de lo cual, las células se lavaron 5 veces con 1.5 mL de PBS- 2% SFB- 0.1% azida de sodio a 4°C, se resuspendieron en 450 µL de la misma solución y se analizaron en un citómetro de flujo.

Fijación de células

Para fijar las células (previamente cultivadas con los anticuerpos); éstas se cosecharon y resuspendieron en 5 mL de PBS frío, se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm, se resuspendió el botón celular. Las células se lavaron 2 veces con 5 mL de PBS frío. Después del último lavado, el botón celular se resuspendió y las células (10^6) se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 100 µL de una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. La reacción se detuvo con 20 µL de glicina 200 mM, en hielo durante 5 minutos. Al término de la incubación las células se lavaron 3 veces con HBSS frío. Al finalizar los lavados, las células se resuspendieron en 0.5 mL de medio completo y se contaron en cámara de

Neubauer. En el caso de células tratadas con m- β C o linfocitos B de bazo la fijación se realizó con paraformaldehído al 0.75%.

Estudios de presentación de antígeno

Estos ensayos consistieron en cultivar las CPA (LK-35.2 o linfocitos B de bazo) con linfocitos T CD4 (hibridomas o transgénicos para el TCR anti-LG 48-62) en presencia de antígeno para evaluar la eficiencia de presentación de antígeno de las primeras. Para estos experimentos, se cosecharon las CPA y los hibridomas de linfocitos T, se resuspendieron en RPMI-1640 suplementado y se contaron en una cámara de Neubauer utilizando azul tripano para excluir del conteo a las células muertas. Se cultivaron en placas de 96 pozos y por triplicado; células LK-35.2 (número variable) o linfocitos B de bazo ($5.0x10^4$), con hibridomas de linfocitos T ($5.0x10^4$), en presencia diferentes concentraciones del antígeno, de péptido sintético o en ausencia de ambos, en un volumen final de 200 µL. Después de 24 horas de cultivo, las placas se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos, y se recolectaron 100 µL de sobrenadante para determinar la IL-2.

Determinación de la producción de IL-2 como medida del reconocimiento antigénico por los hibridomas T

La eficiencia de la presentación de antígeno, se determinó por la presencia de IL-2 en los sobrenadantes del estudio de presentación de antígeno, la cual es secretada por los linfocitos T CD4 en forma directamente proporcional a su activación. La producción de IL-2 se evaluó por la proliferación de células dependientes de IL-2 (CTLL-2) en presencia ³H-TdR. De tal forma, que incorporación de ³H-TdR por estas células es proporcional a la IL-2 presente en el sobrenadante, indicando, en forma indirecta la eficiencia de activación de los linfocitos T CD4 debida a la presentación de antígeno por las CPA.

Para determinar la IL-2 presente en los estudios de presentación de antígeno, las CTLL-2 se cosecharon y lavaron extensamente (3 veces con 15 mL de HANKS, centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos, entre cada lavado). Al finalizar los

lavados, las CTLL-2, se resuspendieron en medio completo y se contaron en una cámara de Neubauer. Las células CTLL-2 (10^4) se adicionaron en un volumen de 100 µL a los 100 µL del sobrenandante del ensayo de presentación de antígeno, y se cultivaron durante 32 horas en placas de 96 pozos. A las 20 horas de cultivo se añadió 1 µCi ³H-TdR a cada pozo, cultivándose por las 12 horas restantes, hasta que se cosecharon en un cosechador semiautomático (Tomtec). La síntesis de DNA se determinó en un contador de centelleo (Wallac). Los resultados de los estudios de presentación de antígeno se muestran como promedio de los valores de cpm de los triplicados indicando con barras de error estándar en cada caso.

Proliferación de linfocitos T CD4 y cuantificación de citocinas.

Estos experimentos fueron realizados con el apoyo de Dr. Dario Vignali y el Dr. José Moreno, en St. Jude Children's Research Hospital.

Para la determinación de la proliferación de linfocitos T CD4 y la cuantificación de citocinas, se cultivaron por triplicado y en dos placas de 96 pozos; 2.5×10^4 células LK-35.2 fijadas (previamente tratadas con los anticuerpos; anti-CD40 o anti-CD11b) con 5.0 $\times 10^4$ linfocitos T CD4 del ratón 3A9, en presencia de concentraciones variables del péptido 48-63 de la LG. Después de 48 horas de cultivo se determinó la proliferación de los linfocitos T CD4 y la producción de citocinas. Para el primero, se adicionó en una placa, 1 µCi 3H-TdR a cada pozo, cultivándose durante 18 horas más. Al término de la incubación, los cultivos fueron cosechados en un cosechador semiautomático y la síntesis de DNA fue determinada en un contador de centelleo.

La determinación de las concentraciones de IL-2 e IFN γ se obtuvó por medio de un método de citometría de flujo basado en partículas fluorescentes. Brevemente, se recuperaron 100 µL del sobrenadante de la segunda placa de 96 pozos, los cuales se incubaron con perlas fluorescentes acopladas a anticuerpos anti-IL-2 y anti-IFN γ , seguidas por segundos anticuerpos dirigidos contra las

46

mismas citocinas, marcados con ficoeritrina. Las muestras se analizaron en un citometro de flujo FACSalibur con un equipo Luminex, y la concentración de las citocinas fue determinada interpolando los valores obtenidos en una curva patrón de cada citocina.

Citometría de flujo.

Para analizar la expresión de moléculas en superficie, se utilizaron 2.5×10^4 células LK35-2 o linfocitos B de bazo que se resuspendieron en placas de 96 pozos en un volumen de 200 µL. Las placas se centrifugaron durante 3 minutos a 1200 rpm. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en 50 µL de PBS con 0.1% azida y 1% de suero de conejo (PBS-Azida-SC) durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, las placas se centrifugaron 3 minutos a 1200 rpm, y el sobrenadante se desechó. El botón celular se resuspendió en 50 µL de una solución de PBS-Azida-SC que contenía los anticuerpos dirigidos contra las diferentes moléculas de interés, y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Al finalizar la incubación, se adicionó 100 µL de PBS-azida-SC y se centrifugó 3 minutos a 1200 rpm. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular, y las células se lavaron 2 veces con 200 µL de PBS-azida-SC frío, centrifugándose 3 minutos a 4 °C y 1200 rpm entre cada lavado. Al finalizar estos, el botón celular se resuspendió en 450 µL de PBS-azida-SC y fueron transferidos a tubos de FACS para ser analizados.

En el caso de tinciones indirectas, el botón celular del último lavado se resuspendió en 50 µL de una solución PBS-azida-SC que contenía los anticuerpos secundarios o estreptoavidina, marcados con fluorocromos, los cuales se incubaron en hielo durante 20 minutos. Al terminar la incubación, las muestras se lavaron con PBS-azida-SC y transfirieron a tubos de FACS. El análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Desregulación del TCR

Para estos experimentos se cultivaron en placas de 6 pozos; células LK-35.2 en presencia de anti-CD40 o anti-CD11b, y con concentraciones variables deLG. Después de 24 horas de cultivo las células se lavaron y fijaron, como se describió previamente. Posteriormente se cultivaron por seis horas a 37 °C; 0.166 x10⁶ células LK-35.2 fijadas con 0.5x10⁶ hibriomas de linfocitos T (A6B3), en tubos Falcon de 15 mL, y en un volumen final de 0.5 mL. Para facilitar la interacción celular, las células se centrifugaron a 500 rpm durante 2 minutos. Al finalizar la incubación las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos anti-TCR marcados con APC, y se analizaron en un citometro de flujo.

Microscopia confocal.

Células LK35.2 (10⁴) se cultivaron a 37°C en portaobjetos de vidrio especiales para cultivo (), durante 24 horas en un volumen de 200 µL, después de lo cual se adicionaron 10 µg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control) y se incubaron nuevamente a 37°C por distintos tiempos. Las laminillas se lavaron con PBS filtrado (0.22 µm), y se fijaron con paraformaldehído al 4%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar la fijación, las laminillas se lavaron dos veces con PBS filtrado, y se adicionaron 50 µL de PBS filtrado con los anticuerpos anti-MHCII-biotina (estreptoavidina-Rojo Texas o Alexa 488) anti-CD80-Rojo Texas o la subunidad B de la toxina del cólera (CTB-Alexa 488, que se une al gangliósido GM-1) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas se lavaron tres veces con PBS, se adicionó 1 µL de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por muestra y se montaron los cubreobjetos, que se sellaron con resina acrílica. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss, modelo LSM510 equipado con un láser dual. La fluorescencia se detectó simultáneamente con excitación/emisión a 488/520 nM para FITC o Alexa 488, y a 540/590 nm para el rojo Texas. Las imágenes (100x) se adquirieron con una resolución de 2048x2048 pixeles y se almacenaron en la computadora, después de lo cual se procesaron y se analizaron por medio del software LSM5 Image Examiner (Carl Zeiss).

Resultados

El estímulo a través de CD40 mejora la función del linfocito B como CPA.

Para estudiar el papel de CD40 en la función del linfocito B como CPA realizamos experimentos con el modelo de presentación de antígeno que se tiene en el laboratorio. En este modelo se utiliza como antígeno la lisozima de gallina (LG), como CPA el linfoma murino LK-35.2, que expresa la MHCII IA^k y es CD40+ y, como células respondedoras, hibridomas de linfocitos T CD4 que reconocen distintos péptidos de LG unidos a MHCII IA^k. La estimulación a través de CD40 se realizó con un anticuerpo monoclonal agonista (1C10) que reconoce la molécula CD40 murina, y como control negativo de isotipo un anticuerpo monoclonal anti-CD11b, que no se expresa en las células LK-35.2.

En la figura 1 se presenta el resultado del estudio de presentación de antígeno, en cual se confirma que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA. Esto se observó claramente cuando el número de CPA (LK-35.2) fue subóptimo; en donde las células LK-35.2 estimuladas a través de CD40 fueron ≈1.3 veces mejores CPA que las células controles en los estudios con los hibridomas A6B3 (12,500 CPA/pozo) y 2B6 (6000 CPA/pozo); 2 veces mejores CPA con el hibridoma C10 (3000 CPA/pozo); 2.5 veces mejores CPA con el hibridoma 4G4.1 (25,000 CPA/pozo); y 5 veces mejores CPA con el hibridoma 2G7 (12,500 CPA/pozo). De los cinco hibridomas de linfocitos T CD4 utilizados, el mayor efecto de la estimulación a través de CD40 se observó con el hibridoma 2G7 (LG 1-18), que fue el hibridoma con menor respuesta basal (cpm \approx 5000). Esta baja respuesta basal puede se debido a que el número de complejos MHCII-LG 1-18 en superficie sean insuficientes para inducir la activación del hibridoma 2G7. Considerando lo anterior, podría ser probable que el efecto de CD40 sea relevante cuando el número de complejos MHCII-péptido en superficie sea subóptimo para activar al linfocito T CD4.

Por otro lado, en prácticamente todos los hibridomas de linfocitos T CD4 (con excepción del hibridoma 2G7), el efecto de CD40 disminuyó e incluso desapareció cuando se incrementó el número de CPA en el cultivo. Esto puede ser debido a que al aumentar el número de CPA se aumenta el número de complejos MHCII-péptido que pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD4; lo cual podría saturar su capacidad de producción de IL-2, y/o del sistema de detección de ésta, por lo que no podría detectarse ningún cambio en la función de la CPA.



Figura 1 El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA. Se cultivaron durante 24 horas, el número de células LK-35.2 indicado en las figuras con 5.0×10^4 hibridomas de linfocitos T CD4 y en presencia de 10 µg/mL de LG y de anti-CD40 o anti-CD11b (control). La determinación de IL-2 se realizó como se indica en a sección de material y métodos. Los resultados se expresan como el promedio de las cpm de los triplicados, indicando en barras el error estándar. Se muestra un experimento representativo de dos.

Considerando que CD40 mejora la función de LK-35.2 para activar a hibridomas de linfocitos T CD4 que reconocen diferentes determinantes de la LG, es muy probable que al menos un mecanismo responsable de esto sea independiente a

la generación del determinante antigénico. Además, debido a que el efecto de CD40 es notable cuando el sistema de presentación de antígeno es ineficiente (número subóptimo de CPA), este efecto podría ser relevante cuando el número de complejos MHCII-péptido sea bajo, ya sea por concentraciones limitantes de antígeno o de CPA.

Adicionalmente a la presentación de la LG exógena, evaluamos el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 en la presentación péptidos derivados de dos formas de LG endógena: una con señal de retención en el retículo endoplásmico, LG-KDEL; y la otra soluble, LG. Estas proteínas se expresan en las líneas LK-LG-KDEL y LK-LG, respectivamente. Ambas líneas presentan péptidos de la LG unidos a MHCII IA^k en forma constitutiva, y su generación y/o procesamiento difiere de la LG exógena^{268, 269}.

De forma similar a LK-35.2, el estímulo a través de CD40 mejoró la eficiencia de LK-LG-KDEL y LK-LG para activar a los distintos hibridomas de linfocitos T CD4, lo cual fue notable cuando el número de éstas fue subóptimo (Fig 2). En el caso de LK-LG-KDEL, la estimulación a través de CD40 aumentó al doble su capacidad como CPA frente al hibridoma 2B6 (25,000 CPA/pozo) y ≈1.5 veces con los hibridomas A6B3 (25,000 CPA/pozo) y C10 (12,500 CPA/pozo). El mejor efecto de anti-CD40 se observó con los hibridomas 2G7 (50,000 CPA/pozo) y E907.D (25,000 CPA/pozo) en donde fueron 11 y 19 veces mejores CPA que las células controles, respectivamente. En el caso de LK-LG, el estímulo a través de CD40 aumentó su eficiencia como CPA aproximadamente 1.5 veces para 2B6 (3,000 CPA/pozo) y C10 (6,000 CPA/pozo), ≈2.5 para A6B3 (3,000 CPA/pozo) y E907 (6,000 CPA/pozo); y 4 veces para 2G7 (25,000 CPA/pozo). Los resultados de LK-LG fueron similares a los de la LG exógena (Fig 1); en donde el mejor efecto de anti-CD40 fue con el hibridoma 2G7 (LG 1-18), mientras que con los demás hibridomas el efecto de anti-CD40 disminuyó al aumentar el número de CPA en el estudio.



Figura 2 El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA independientemente de la localización del antígeno. Se cultivó un número variable de células LK-LG-KDEL o LK-LG con 5 x 10⁴ hibridomas T en presencia de anti-CD40 o anti-CD11b (control) durante 24 horas La determinación de IL-2 se realizó como se indica en a sección de material y métodos. Los resultados se expresan como el promedio de cpm de los triplicados, indicando en barras el error estándar. Se muestra un experimento representativo de dos independientes con resultados similares.

Debido a que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de LK-35.2 como CPA, en la presentación de diferentes péptidos derivados de distintas formas de LG (exógena, soluble o con señal de rentención en el RE), cuya generación depende de diferentes procesamientos; es muy probable que CD40 induzca cambios que sean independientes al procesamiento de antígeno. Sin embargo, el hecho de que la magnitud del efecto de CD40 varía considerablemente en las tres formas de LG, sugiere también la participación de cambios que estuviesen relacionados al procesamiento de antígeno; y que sean estos cambios los que expliquen el mayor efecto en la presentación de los péptidos derivados de LG-KDEL. Alternativamente, otra posibilidad no excluyente, es que el efecto de anti-CD40 se aprecie mejor utilizando LK-LG-KDEL, debido a que es el sistema de presentación de antígeno menos eficiente (en condiciones basales se necesitó un mayor número de CPA para alcanzar la óptima respuesta de los hibridomas de linfocitos T CD4), lo que podría ser debido a un menor acceso de la proteína a los compartimientos de la vía endocítica, a la eficiencia de generación de los péptidos estudiados y/o a la estabilidad de los complejos MHCII-péptido en superficie.

Para evaluar que el efecto de anti-CD40 no fuera particular de LK-35.2, utilizamos como CPA una línea celular derivada de fibroblastos, LKK. Ésta fue previamente transfectada con el cDNA que codifica para las moléculas MHCII IA^k y además es CD40+. Similar a LK-35.2, el estímulo a través de CD40 aumentó la eficiencia de LKK como CPA (Fig. 3). En condiciones basales LK-35.2 fue más eficiente que LKK para activar a los hibridomas de linfocitos T CD4: E907 (LG 33-47) y C10 (LG 42-68). Sin embargo, el efecto de CD40 fue similar en ambas líneas celulares, siendo óptimo a una concentración de 3 µg/mL de LG; en donde fueron aproximadamente 6 y 3 veces más eficientes para activar a los hibridoma de T CD4 E907 y C10, respectivamente. Similar a los resultados anteriores, el efecto de CD40 disminuye al optimizar las condiciones del estudio de presentación de antígeno, en este caso debido al aumento en la concentración del antígeno en el cultivo. Estos resultados indican que el aumento en la

eficiencia como CPA de LK-35.2, inducido por el estímulo a través de CD40, no es una particularidad de éstas y que puede ocurrir en células que no son CPA profesionales, como LKK.



Figura 3 El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de activación de linfocitos T CD4 independientemente del tipo de CPA. Se cultivaron durante 24 horas; 2.5 x 10⁴ células LK-35.2 o LKK con 5.0 x 10⁴ hibridomas de linfocitos T CD4, en presencia de anti-CD40 o anti-CD11b (control), y las concentraciones de LG indicadas en la figura. La determinación de IL-2 se realizó como se indica en a sección de material y métodos. Los resultados se expresan como el promedio de las cpm de los triplicados, indicando en barras el error estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

Finalmente, para asegurar que los resultados obtenidos no fueran particulares del procesamiento de la LG, se realizaron estudios de presentación de antígeno utilizando otro antígeno, la RNAasa A bovina. Ésta a diferencia de la LG exógena, se presenta eficientemente por MHCII en ausencia de la cadena invariante (el determinante antigénico 43-56) y sus complejos MHCII-péptidos se forman con MHCII de reciclaje en compartimientos de la vía endocítica diferentes que los de la LG^{270, 271}.

El estudio de presentación de antígeno se realizó cultivando células LK-35.2 con diferentes concentraciones de RNAasa A bovina o LG, en presencia de cualquiera de los siguientes hibridomas: TS12 (RNAasa A 43-56), C10 (LG 42-68) y E907 (LG 33-47); y de anticuerpos anti-CD40 o control. En ambos antígenos las células LK-35.2 cultivadas con anti-CD40 fueron mejores CPA que las células control; lo cual fue evidente a concentraciones subóptimas de antígeno (Fig. 4). El efecto más notable de anti-CD40 se encontró a 1 y .3µg/mL de LG para los hibridomas E907 y C10, respectivamente; y a 1 µM RNAasa A para TS12. En el caso del hibridoma C10, y E907, las células LK-35.2 estimuladas a través de CD40 fueron ≈3.5 y 8 veces mejores CPA que las células controles, respectivamente; mientras que fueron ≈2.5 veces más eficientes para activar al hibridoma TS12. De forma similar a la figura 3, el efecto de CD40 disminuyó al aumentar la concentración del antígeno.



Figura 4 El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA independientemente del antígeno. Se cultivaron durante 24 horas, 2.5×10^4 células LK-35.2 con 5.0×10^4 hibridomas de linfocitos T CD4 C10 o TS12 a las concentraciones de LG o RNAasa A indicadas, y en presencia de 10 µg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control). La determinación de IL-2 se realizó como se indica en a sección de material y métodos por proliferación de células CTLL-2. Los resultados se expresan como el promedio de las cpm de los triplicados, indicando en barras el error estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Estos resultados indican que la estimulación a través de CD40 aumenta la eficiencia de presentación de antígeno por linfocitos B independientemente del tipo de antígeno y de sus diferentes vías de procesamiento; lo que sugiere la participación de mecanismos alternos al procesamiento de antígeno. Sin embargo, el hecho de que el efecto de CD40 ocurra con diferente magnitud dependiendo del determinante antigénico y de la localización intracelular de la proteínas (LG exogéna, LG soluble o LG-KDEL) podría sugerir la participación de mecanismos relacionados con su procesamiento y presentación. Debido a esto, decidimos investigar si el estímulo a través de CD40 modificaba algunas etapas generales del procesamiento de antígeno, que resultarán en una mayor eficiencia en la activación del linfocito T CD4.

De las diferentes etapas del procesamiento de antígeno (internalización del antígeno, síntesis y transporte de las MHCII a la vía endocítica, degradación del antígeno y de la cadena li, formación de complejos MHCII-péptido y su transporte a la membrana plasmática), decidimos evaluar inicialmente la internalización del antígeno.

El estímulo a través de CD40 no modifica la internalización del antígeno.

Para evaluar si el estímulo a través de CD40 aumentaba la internalización del antígeno, se marcó LG con Alexa-488, y se evaluó la capacidad de las células LK-35.2, pre-estimuladas por diferentes tiempos con anti-CD40 o un anticuerpo control de isotipo, para internalizar esta proteína durante 3 horas. En la figura 5 se muestra que el estímulo a través de CD40 no modifica la internalización del antígeno, ya que las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de las células tratadas con anti-CD40 o el anticuerpo control son similares; por lo que el aumento en la eficiencia de LK35.2 como CPA debido a la estimulación a través de CD40, no es debido a una mayor cantidad de antígeno intracelular.



Figura 5 El estímulo a través de CD40 no modifica la internalización del antígeno. Células LK35.2 previamente cultivadas durante 21 horas en presencia o ausencia de 10 µg/mL de los anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b (control), se incubaron por 3 horas más con LG-Alexa-488 y los anticuerpos anteriores. La internalización de LG-Alexa-488 se determinó como la intensidad media de fluorescencia (IMF) en un citometro de flujo. La IMF para células mantenidas a 4 °C en presencia de LG-Alexa 488 fue de 4.5. Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados de la IMF, indicando en barras el error estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de los linfocitos B como CPA independientemente del procesamiento de antígeno.

Adicionalmente a la internalización del antígeno, otra etapa importante en la presentación de antígeno es la generación de péptidos; por lo que evaluamos si el estímulo a través de CD40 aumenta la capacidad de las células LK-35.2 como CPA cuando el procesamiento del antígeno a péptidos no es necesario. Para esto, realizamos estudios de presentación de antígeno con péptidos sintéticos de LG en lugar de la proteína completa.

Los resultados obtenidos indican que el estímulo a través de CD40 aumenta la efciencia de las células LK-35.2 como CPA a través de mecanismos alternos a la generación de los péptidos (Fig. 6). En los hibridomas C10 y A6B3 el efecto de anti-CD40 fue más notable a concentraciones intermedias del péptido, efecto que se perdió al aumentar la concentración del péptido. Utilizando estos hibridomas,

las células LK-35.2 cultivadas con anticuerpos anti-CD40 fueron ≈ 2 y 3 veces más eficientes como CPA, que las mismas tratadas con el anticuerpo control (Fig. 6), lo cual se observó a las concentraciones de los péptidos de LG de 0.3 µM para A6B3 y 0.1 µM para C10, respectivamente. En el caso de E907.D, la estimulación a través de CD40 aumentó aproximadamente 3 veces la eficiencia de LK-35.2 como CPA, lo que se mantuvo incluso al aumentar la concentración del péptido. De hecho, para este hibridoma, la respuesta basal fue similar a las concentraciones de péptido de .3 y 1 µM, lo cual sugiere que se requiere una mayor concentración del péptido para optimizar la respuesta basal de E907.D



Figura 6 El estímulo a través de CD40 aumenta la presentación de antígeno independientemente a la generación de los péptidos. Se cultivaron durante 24 horas; 2.5×10^4 células LK-35.2 y 5 x 10^4 hibridomas de linfocitos T CD4 con las concentraciones de los péptidos de LG indicadas figura, y en presencia de 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b (control). La determinación de IL-2 y de las cpm se realizó como se indica en material y métodos. Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados, indicando con barras el error estándar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Considerando que la estimulación de linfocitos B a través de CD40 aumenta la eficiencia de presentación de péptidos sintéticos, que no requieren ser degradados para unirse a las MHCII, es probable que uno de los mecanismos responsables de este efecto sea independiente a la generación de péptidos.

Finalmente, para descartar la participación de cualquier etapa del procesamiento de antígeno (internalización del antígeno, generación de péptidos, transporte intracelular del antígeno/péptido, formación de los complejos MHCII-péptido antes de su transporte a la superficie celular) en el efecto de anti-CD40; se cultivaron células LK-35.2 con los anticuerpos anti-CD40 o control por 24 horas, y al finalizar la incubación se fijaron. Estas células fijadas se utilizaron en el estudio de presentación de antígeno, en el cual se adicionó el hibridoma de linfocitos T CD4 y los péptidos de LG. Estos últimos, debido a que la CPA está fijada, se unen a las MHCII vacías en su membrana plasmática, por lo que su presentación no depende de su manejo intracelular.

Los resultados obtenidos indican que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA por cambios independientes al procesamiento de antígeno (Fig. 7). Las células LK-35.2 pretratadas con anti-CD40 fueron más eficientes para activar a los linfocitos T que las células control, lo cual fue evidente para E907.D y A6B3 a concentraciones del péptido 33-47 de 1 y .1 μ M, respectivamente. A estas concentraciones las células LK-35.2 estimuladas a través de CD40 fueron ≈2.5 y 3 veces más eficientes para activar a los hibridomas E907.D y A6B3, respectivamente.

De acuerdo a estos resultados, el estímulo a través de CD40 aumenta la efciencia de las células LK-35.2 como CPA por medio de modificaciones que son independientes al procesamiento de antígeno. Esto, no excluye la posible participación del procesamiento de antígeno en el efecto de CD40, sino que describe la participación de otras modificaciones o cambios alternos a él. Uno de estos cambios podría ser debido al aumento en el número de MHCII en la superficie, que pudieran captar más péptido, o bien, que el efecto fuera sobre moléculas coestimuladoras; por lo que decidimos analizar estas posibilidades.



Figura 7 El estímulo a través de CD40 mejora la presentación de antígeno por linfocitos B independientemente al procesamiento de antígeno. Se cultivaron células LK-35.2 en presencia de 10 μ g/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control) durante 24 horas, y posteriormente se fijaron con paraformaldehído. 2.5 x 10⁴ células LK-35.2 fijadas se cultivaron con 5 x 10⁴ células de los hibridomas T, E907.D ó A6B3, en presencia del péptido LG33-47 a las concentraciones indicadas. La determinación de IL-2 se efectuó como se describe en material y métodos. Los resultados se presentan como el promedio <u>+</u> el error estándar (en barras) de los triplicados en cpm. Se presenta un experimento representativo de tres experimentos independientes.

El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de reconocimiento de los complejos MHCII-péptido.

Se ha descrito en la bibliografía que la expresión del TCR en la membrana plasmática disminuye después del reconocimiento de los complejos MHCII-péptido²⁷². En base a esto, evaluamos si el estímulo a través de CD40 aumentaba la eficiencia del reconocimiento de los complejos MHCII-péptido; para lo cual cultivamos durante 24 horas, células LK35.2 con anti-CD40 o el anticuerpo control en presencia de diferentes concentraciones del antígeno. Al finalizar las células se fijaron y se cultivaron con el hibridoma de linfocito T A6B3 (LG 35-45) durante 6 horas; después de lo cual se evaluó la expresión del TCR. Por otro lado, con estas mismas células (A6B3 y las CPA fijadas), se realizó un estudio de presentación de antígeno para correlacionar la desregulación del TCR con la capacidad de la CPA para activar al linfocito T CD4.

Los resultados indican que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de reconocimiento de los complejos MHCII-péptido, lo que correlaciona positivamente con la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA (Fig 8). Las células LK-35.2 estimuladas a través de CD40 indujeron la desregulación del TCR a partir de 10 µg/mL de LG siendo evidente a 1 mg/mL, mientras que con las células controles se observó un ligera desregulación del TCR solo a la concentración de 1 mg/mL de LG. Por otro lado, las células cultivadas con anti-CD40 fueron ≈2.5 veces más eficientes como CPA que las células controles.



Expresión del TCR



A)

Figura 8 El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de reconocimiento de los complejos MHCII Durante 24 horas se cultivaron células LK-35.2 en presencia de 10 μ g/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control), y con diferentes concentraciones de LG. Al finalizar, las células se fijaron. **A**) Se cultivaron 0.166x10⁶ células LK-35.2 fijadas con 0.5x10⁶ hibridomas T A6B3, durante 6 horas. Al finalizar las células se tiñeron con anti-TCR. **B**) Se realizó el estudio de presentación de antígeno con 0.5x 10⁴ células LK-35.2 fijadas y 5x10⁴ hibridomas A6B3. La determinación de IL-2 se realizó como se indica en material y métodos. Los resultados se presentan como el promedio de las cpm, indicando en barras el error estándar. Se presenta un experimento representativo de dos experimentos. Estos resultados sugieren que un mecanismo por el cual el estímulo a través de CD40 mejora la eficiencia de la CPA es a través de cambios que afectan la interacción TCR-MHCII; esto puede ser debido a la presencia de un mayor número de complejos MHCII-péptido específico en la CPA, y/o a cambios que mejoren la eficiencia en la interacción TCR-MHCII. Por otro lado, es necesario corroborar la interpretación de estos resultados, ya que sea descrito que la disminución en la expresión del TCR puede deberse a la activación de PKC (independiente al reconociemiento de MHCII-péptido)²⁷³.

El estímulo de linfocitos B a través de CD40 aumenta la expresión de CD80 en superficie, sin modificar la expresión de MHCII, CD86 e ICAM-1.

Para evaluar si el estímulo a través de CD40 aumentaba la expresión de MHCII, (lo que podría aumentar el número de complejos MHCII-péptido presentados a los linfocitos T CD4), y/o de moléculas que participan positivamente en la sinapsis inmunológica como CD80, CD86 e ICAM-1; se analizó la expresión de estas moléculas en células LK-35.2 cultivadas en presencia de anticuerpos anti-CD40 o control durante diferentes tiempos. La expresión de estas moléculas se determinó mediante citometría de flujo. Los datos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) se presentan como índice de estimulación, [(IMF de células tratadas con anti-CD40/IMF de las células controles)-1] que indica el número de veces en que la expresión de una molécula es mayor con respecto a su expresión basal; permitiendo así comparar en una sola figura, moléculas con diferentes niveles basales de expresión en superficie.

En la figura 9, se muestran los resultados, en donde se observa que el estímulo a través de CD40 induce un aumento en los niveles de expresión en superficie de CD80, sin modificar los niveles de expresión de las moléculas MHCII, ICAM-1 y CD86. Los niveles de CD80 empezaron a aumentar después de 6 horas de estimulación con anti-CD40, duplicándose entre las 12 y 24 horas, para diminuir después de 72 horas de estimulación.

62



Figura 9 El estímulo a través de CD40 aumenta la expresión de CD80 en la superficie celular. 2 x 10⁵ células LK-35.2 se cultivaron en presencia de 10 μg/mL de anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b (control) por los tiempos indicados en la figura. Al finalizar el cultivo, las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos específicos para cada una de las moléculas indicadas. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo. Los resultados se presentan como el índice de estimulación menos 1 [(IMF de las células tratadas con anticuerpos anti-CD10/IMF de las células tratadas con anticuerpos anti-CD11b) menos 1]. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

.

A pesar que la expresión de MHCII permaneció sin cambios, desconocemos si el número de complejos MHCII-péptido es similar entre las células estimuladas a través de CD40 y las células controles, por lo que no podemos establecer una relación con la desregulación del TCR. Por otro lado, considerando que CD80 es uno de los ligandos de CD28, es posible, que el aumento en la eficiencia del linfocito B como CPA inducida por anti-CD40 fuera debida en parte, a la mayor expresión de CD80 en superficie; por lo que decidimos evaluar si existía una correlación positiva entre ellos.

El estímulo a través de CD40 aumenta la función del linfocito B como CPA en un tiempo muy corto, que es independiente de la mayor expresión de CD80 y de cambios en el procesamiento de antígeno.

Para evaluar si existía una correlación entre la expresión de CD80 y el aumento en la capacidad del linfocito B como CPA la eficiencia como CPA; se evaluaron ambas simultáneamente, en células LK-35.2 cultivadas por diferentes tiempos con anti-CD40 o control. Para los estudios de presentación de antígeno, las células LK-35.2, pretratadas con los anticuerpos anti-CD40 o control, se fijaron, y posteriormente se cultivaron con los hibridomas T A6B3 (LG34-45) o TS12 (RNAasa A43-56) en presencia de sus respectivos péptidos. Como se mencionó, debido a que las células LK-35.2 están fijadas, el péptido adicionado se unirá a las MHCII vacías en la membrana plasmática, eliminando cualquier etapa en el procesamiento de antígeno, incluída una posible internalización del péptido.

Los resultados muestran que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de LK-35.2 como CPA, previo al aumento en los niveles de CD80 en su superficie (Fig. 10). En el estudio de presentación de antígeno con el hibridoma A6B3 (LG34-45), las células LK-35.2 cultivadas durante 30 minutos con anti-CD40 fueron el doble de eficientes como CPA que las células control; lo que aumentó progresivamente con el tiempo de estimulación con anti-CD40, alcanzando su máximo a las 12 horas de cultivo, en donde fueron 4 veces más eficientes como CPA. Después de 12 horas de estimulación con anticuerpos anti-CD40, la eficiencia de las células LK-35.2 empezó a decaer, duplicando la capacidad de CPA de las células controles a las 72 horas post-estímulo. En el estudio de presentación de antígeno utilizando el hibridoma TS12 (RNAasa A43-56) los resultados fueron similares a los obtenidos con A6B3. En relación a la expresión de CD80, las células LK-35.2 estimuladas a través de CD40 expresaron mayores niveles de CD80 que las células controles. Esto se observa después de una estimulación con anti-CD40 por 6 horas, siendo del doble entre 12 y 24 horas de estimulación, y regresando a los niveles basales a las 72 horas post-estímulo.

De acuerdo a que el estímulo a través de CD40 por tiempos menores a 6 horas no modifica el nivel de expresión de CD80 en superficie, es posible que el aumento en la capacidad de las células LK-35.2 como CPA durante este tiempo sea independiente al aumento de CD80. Mientras que a tiempos mayores de estimulación (12-24 horas), existe una correlación positiva entre la eficiencia de

las células LK-35.2 como CPA y su expresión de CD80 en superficie, siendo ambas óptimas, por lo que podrían estar relacionadas. Además, debido a que las células LK-35.2 fueron previamente fijadas, el aumento en su función como CPA es independiente a modificaciones en el procesamiento de antígeno



Figura 10 El estímulo a través de CD40, por tiempos cortos, aumenta la función del linfocito B como CPA independientemente del incremento en la expresión de CD80 en superficie y de modificaciones en el procesamiento de antígeno. Células LK-35.2 se cultivaron en presencia de 10 μg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control) por los tiempos indicados. Al finalizar los cultivos, las células se lavaron y cada muestra se dividió en dos; en una las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD80-FITC (izq.), y en la otra se fijaron y se utilizaron en un estudios de presentación de antígeno utilizando los hibridomas T, A6B3 o TS12, y en presencia de .3 μM del péptido LG33-47 ó 3 μM del péptido RNAasa A43-56, respectivamente. La determinación de IL-2 y de las cpm se efectuó como se indica en material y métodos. Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados en cpm, indicando con barras el error estándar en cada caso, y es un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Adicionalmente a la presentación de proteínas exógenas como LG o RNAasas A, el efecto temprano de CD40 en la función de la CPA, ocurrió también con células LK-LG-KDEL (presentan de péptidos derivados de LG con señal de retención en el retículo endoplásmico), figura 11. Las células LK-LG-KDEL se estimularon con anti-CD40, se fijaron, y posteriormente se evaluó su función como CPA con los hibridomas A6B3 y E907.D. En el caso de E907.D, las células LK-LG-KDEL cultivadas por 30 minutos con anti-CD40 fueron el doble de eficientes como CPA; eficiencia que triplicó después de 3 horas de estimulación a través de CD40. En el caso de A6B3, se requirió una estimulación por 3 horas para aumentar al doble la eficiencia de LK-LG-KDEL como CPA.



Figura 11 El estímulo a través de CD40, por tiempos cortos, aumenta la función del LK-LG-KDEL como CPA. Células LK-LG-KDEL se cultivaron en presencia de 10 μ g/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control) por los tiempos indicados. Al finalizar los cultivos, las células se lavaron y se fijaron. 2.5 x 10⁴ células LK-LG-KDEL fijadas se utilizaron en el estudio de presentación de antígeno con los hibridomas T, A6B3 o E907.D. La determinación de IL-2 se realizó como se indica en material y métodos. Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados en cpm, indicando con barras el error estándar. Se presenta un experimento representativo de dos experimentos independientes.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos con LK-35.2 y LK-LG-KDEL, el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de las CPA, lo cual ocurre desde periodos cortos de estimulación (30 minutos). Este efecto de anti-CD40 es independiente a cambios en el procesamiento de antígeno y del aumento en los niveles de expresión de MHCII, ICAM-1, CD86 y CD80. Esto sugiere que la estimulación por tiempos cortos a través de CD40 aumenta la función del linfocito B como CPA, mediante cambios moleculares no descritos a la fecha, algunos de los cuales podrían estar directamente relacionados con la interacción TCR-MHCII.

Tres horas de estimulación de linfocitos B con anti-CD40 son suficientes para aumentar su capacidad para activar a linfocitos T CD4 vírgenes

Debido a que en los estudios de presentación de antígeno realizados hasta aquí, se utilizaron hibridomas T CD4, cuyo umbral y requerimientos de activación son menores que los de los linfocitos T vírgenes, consideramos importante examinar si el aumento en la eficiencia del linfocito B como CPA inducido por la estimulación a través de CD40 por 3 horas también era suficiente para mejorar su capacidad de activar linfocitos T CD4 vírgenes. Para esto, se purificaron linfocitos T CD4 virgenes de ratones 3A9, que son transgénicos para los genes rearreglados de las cadenas α y β del TCR del hibridoma del mismo nombre, que reconoce el péptido LG 48-62 unido a moléculas MHCII IA^k. Estos linfocitos T CD4 purificados se utilizaron en el estudio de presentación de antígeno, en donde se cultivaron con células LK-35.2 fijadas, las cuales previamente se habían cultivado por tres horas en presencia de anti-CD40 o anticuerpo control, y con concentraciones progresivas del péptido LG 48-63. A las 48 horas de cultivo se evaluó la proliferación y producción de IL-2 e IFN γ por los linfocitos T CD4.

Los resultados de este experimento muestran que el estímulo a través de CD40 por tres horas fue suficiente para aumentar la activación de linfocitos T CD4 virgenes (Fig 12). Las células LK-35.2 cultivadas con anti-CD40 fueron más eficientes para inducir la proliferación de linfocitos T CD4, así como la producción de IL-2 e IFN γ , que las células tratadas con el anticuerpo control. En relación a la proliferación, las células LK-35.2 cultivadas con anti-CD40 inducieron hasta 5 veces la proliferación de linfocitos T, lo cual se observó a concentraciones de péptido entre 0.1 a 1 μ M. Mientras que la producción de IL-2 y de IFN γ fue hasta 9 y 10 veces mayor, respectivamente, en células tratadas con anti-CD40 que en las células control.

Estos resultados nos permiten concluir que las modificaciones inducidas por la estimulación de células LK-35.2 a través de CD40 por 3 horas, mejoran la

activación de linfocitos T CD4 vírgenes, lo que sugiere la posibilidad de estas modificaciones pudieran ser relevantes *in vivo*.



LG Péptido 48-63 (µM)

Figura 12 El estímulo a través de CD40 durante 3 horas aumenta la capacidad de las células LK-35.2 para activar a linfocitos T CD4 vírgenes. Células LK-35.2 se cultivaron en presencia de 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD40 o anti-CD11b (control) por 3 horas. Al finalizar, las células se fijaron y se utilizaron para estudios de presentación de antígeno y determinación de citocinas. Para esto, se cultivaron en dos placas de 96 pozos; 2.5 x10⁴ células LK-35.2 fijadas con 5x10⁴ linfocitos T CD4 virgenes del ratón 3A9, y en presencia de las concentraciones de péptido indicadas en la figura. Posteriormente, y como se indica en material y métodos, en una placa se determinó la proliferación de linfocitos T CD4 y en la otra la producción de citocinas. Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados en cpm, indicando con barras de error estándar en cada caso. Los resultados son de un experimento representativo de dos.

En linfocitos B normales, el estímulo a través de CD40 aumenta la expresión de moléculas MHCII, CD80, CD86 e ICAM-1 en superficie y en paralelo, su eficiencia como CPA.

Hasta ahora hemos encontrado que la estimulación de células LK-35.2 a través de CD40 por tres horas, induce modificaciones en éstas, suficientes para aumentar su función como CPA e inducir una eficiente activación de linfocitos T CD4 vírgenes. Sin embargo, es importante considerar que las células LK-35.2 son hibridomas y por lo tanto su comportamiento puede ser diferente del de los

linfocitos B normales. Por esto, era necesario explorar si la estimulación de linfocitos B normales de bazo a través de CD40 modificaba su función como CPA de la misma forma.

Para esto, se purificaron linfocitos B de bazo por selección negativa con el método de "*panning*", y se cultivaron por diferentes tiempos en presencia de anti-CD40 o anticuerpo control, en presencia de polimixina B, para evitar posibles efectos de lipopolisacárido contaminante. Terminado el tiempo de incubación, los linfocitos B se fijaron y se analizó la expresión de moléculas en superficie (MHCII, ICAM-1, CD86 y CD80), así como su capacidad como CPA, mediante citometría de flujo y estudios de presentación de antígeno, respectivamente.

En la figura 13 se muestran los resultados, en los cuales se observa que el estímulo a través de CD40 aumentó la eficiencia de los linfocitos B como CPA y la expresión de moléculas relacionadas con esta función como: MHCII, CD86, CD80 e ICAM-1. En el estudio de presentación de antígeno, los linfocitos B cultivados por tres horas con anticuerpos anti-CD40 fueron hasta cuatro veces más eficientes para activar al hibridoma T A6B3, que los linfocitos B como CPA se mantuvó hasta las 48 horas de cultivo con anti-CD40, disminuyendo después de 72 horas, en donde fue similar al de las células control. En relación a la expresión de moléculas en superficie; la expresión de MHCII y CD86 aumentó después de 3 horas de activación, con máxima expresión a las 72 horas y a las 12 horas de cultivo, respectivamente. Mientras que la expresión de ICAM-1 y CD80 aumentó después de 12 horas de cultivo con anti-CD40, siendo óptima a las 72 horas.

Α



Estos resultados confirman que el estímulo de linfocitos B a través de CD40 aumenta la expresión de moléculas que participan en la presentación de antígeno como MHCII, ICAM-1, CD80 y CD86 en la superficie celular, al mismo tiempo que aumenta su eficiencia como CPA. Para esto último, son suficientes 3 horas de estimulación a través de CD40, similar a lo observado con células LK-35.2; por lo que los resultados obtenidos con LK-35.2, no son una particularidad de la línea celular y, por lo tanto, podrían ser relevantes *in vivo*. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos B de bazo, en células LK-35.2 el estímulo por tres

horas a través de CD40 no cambió la expresión en superficie de moléculas CD86 y MHCII, lo que nos permite explorar los mecanismos inducidos por la estimulación a través de CD40 independientes del aumento en la expresión de moléculas en superficie y al procesamiento de antígeno, por lo que el resto del trabajo se realizó en células LK-35.2.

Las balsas lipídicas clásicas y la actividad de la proteína-cinasa C (PKC), son necesarias para que el estímulo a través de CD40 por tres horas aumente la eficiencia del linfocito B como CPA.

Para examinar que elementos participaban en aumentar la eficiencia del linfocito B como CPA debido al estímulo a través de CD40 por tres horas; cultivamos durante este tiempo; células LK-35.2 con anti-CD40 o el anticuerpo control, y en presencia de cualquiera de los siguientes inhibidores: azida de Na (inhibe la actividad celular), staurosporina (inhibidor de PKC), wortmanina (inhibidor de PI3-K), citocalasina D (inhibidor del citoesqueleto) y metil- β -ciclodextrina (desestabilizador de las balsas lipídicas clásicas). Esta última, m- β C, se adicionó 10 minutos antes de finalizar los cultivos. Posteriormente, las células se fijaron y se utilizaron en un estudio de presentación de antígeno con los hibridomas C10 (LG 48-62) y E907.D (LG 3-47) y en presencia de sus respectivos péptidos.

Los resultados (Fig. 14) indican que el efecto de anti-CD40 en la eficiencia del linfocito B como CPA depende: de la actividad celular, de las balsas lipídicas clásicas, y de la actividad de PKC; mientras que parece ser independiente de la actividad de PI3-K. Las células LK-35.2 cultivadas con anti-CD40 fueron más eficientes como CPA que las células controles; este efecto de anti-CD40 se perdió al tratar las LK-35.2 con azida de sodio, staurosporina y m-βC, sugiriendo que el efecto de la estimulación a través de CD40 depende de la actividad celular, de PKC y de las balsas lipídicas clásicas. Por otro lado, el efecto de anti-CD40 persistió después del tratamiento con wormaninna, inhibidor de PI3-K, sugiriendo que esta cinasa no participa en este efecto. Es importante mencionar que la staurosporina puede afectar en menor medida la actividad de otras
cinasas como PKA y PKG, por lo que es recomendable realizar estudios más detallados que confirmen la participación de PKC en el efecto de CD40. Por otro lado, aunque todos los inhibidores disminuyeron la capacidad de las células LK-35.2 para activar a los hibridomas E907.D y C10; esto fue notable con citocalasina, la cual prácticamente eliminó la capacidad de LK-35.2 para activar a los hibridomas. Esto demuestra la importancia del citoesqueleto en la función de LK-35.2 como CPA, pero hace difícil evaluar el papel de CD40 en esta función.



Figura 14 El aumento en la eficiencia como CPA de linfocitos B, estímulados a través de CD40 por tres horas depende de la actividad celular, de PKC y de balsas lipídicas Se cultivaron células LK35.2 en presencia de 10 µg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control), y los inhibidores indicados (.1% NaN₃, 20nM staurosporina, 1µM wortmanina, 4µM citocalasina D o 10mM m-βC durante 3 horas. La m-BC se adicionó 10 minutos antes de finalizar el cultivo. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron y se utilizaron en un estudio de presentación de antígeno con los hibridomas C10 y E907.D en presencia del péptido LG 42-68 0.1 μM o péptido LG 33-47 0.3 μM, respectivamente. Los resultados son en cpm promedio de pozos triplicados con error estándar. Se presenta un experimento representativo de dos independientes.

El estímulo a través de CD40 reorganiza las MHCII en la superficie.

Estudios previos han demostrado que la distribución de MHCII en balsas lipídicas clásicas mejora la capacidad del linfocito B como CPA, siendo notable a bajas concentraciones de antígeno¹⁵¹. Considerando que el aumento en la eficiencia de LK-35.2 como CPA, inducido por la ligación de CD40 depende de las balsas lipídicas (Fig 14), evaluamos si este estímulo modificaba la distribución de MHCII en su superficie. Para esto, se cultivaron células LK-35.2 en laminillas en

presencia de anti-CD40 o anti-CD11b (control) por 1, 3 y 24 horas, después de lo cual se fijaron, se tiñeron las MHCII y se observaron en un microscopio confocal.

En la figura 15 se observa que el estímulo a través de CD40 induce la redistribución de MHCII en la membrana plasmática, formando cúmulos o agregados. En condiciones basales (tiempo 0), la distribución de las MHCII fue prácticamente homogénea, encontrándose regiones en donde se forman pequeños cúmulos o agregados constitutivos de MHCII menores a 1.5 µm en la membrana plasmática. Esta distribución de MHCII se mantuvó prácticamente sin cambios durante el estudio cinético en los cultivos con el anticuerpo control, no así en los cultivos con anti-CD40, en los que la distribución de MHCII cambió después de 1 hora de cultivo, formando agregados de MHCII mayores de 1.5 µm, que se hicieron más evidentes a las 3 horas de cultivo. Además, se encontró una distribución polarizada de MHCII, en la membrana plasmática. Ambos patrones de tinción se mantuvieron después de las 24 horas de cultivo con anti-CD40.

Para evaluar el porcentaje de células que presentaban cúmulos de MHCII o polarización de éstas en la superficie, se adquirieron imágenes a una magnificación de 40x en diferentes áreas de las laminillas con las células tratadas con anti-CD40 o anticuerpo control. Se contaron las células en la tinción mostraran cúmulos de MHCII menores de 1.5 µm versus las células con cúmulos mayores de 1.5 µm o con tinciones polarizadas de MHCII.

En los cultivos con el anticuerpo control (Fig. 15 abajo), el porcentaje de células LK35.2 con agregados de MHCII >1.5 µm variaron ligeramente en forma aleatoria y no significativa a través del período de cultivo, siendo en promedio alrededor del 10%. En los cultivos con anticuerpos anti-CD40 al tiempo 0, los porcentajes fueron similares que el control, pero a partir de 1 hora de estimulación con anti-CD40 se elevó a 69 + 14% de células con cúmulos de MHCII >1.5 µm o con patrón polarizado. Esta población aumentó al 83 + 2.5 % a las 3 horas de estimulación, manteniéndose muy similar (85%) a las 24 horas de estimulación.



Figura 15 El estímulo a través de CD40 rearregla las MHCII en superficie. Se cultivaron células LK-35.2 a en portaobjetos de vidrio en presencia de 10 µg/mL anti-CD40 o anti-CD11b (control), 37°C por los tiempos а indicados, se fijaron y se tiñeron con anti-MHCII-biotina y estreptavidina-Rojo Texas. La laminillas se observaron en microscopio confocal. detectando la fluorescencia con excitación/ emisión a 540/590nm simultáneamente. Las imágenes (100x) se adquirieron a una resolución de 2048x2048 pixeles. Arriba. Cada panel contiene la imagen en Nomarsky a la izquierda, a la derecha la tinción para MHCII (Rojo) y abaio representación la tridimensional de la fluorescencia de la célula. Las células mostradas son representativas de al menos 50 células contadas en cada uno de cuatro experimentos independientes.

Abajo. Gráfica del porcentaje de células con agregados de MHCII de diferente tamaño o polarización de éstas. Los datos se presentan como el promedio de 50-200 células de dos o tres experimentos independientes, excepto en *, donde se contaron más de 100 células en un solo experimento.

mayores a 1.5 µm o con un patrón de tinción polarizada

menores a 1.5 µm

Para determinar si la redistribución de MHCII requería de la actividad celular, o era debida a un mecanismo pasivo (consecuencia del entrecruzamiento con el anticuerpo anti-CD40 y considerando que se ha reportado la asociación de las MHCII y CD40 en la membrana plasmática de linfocitos humanos¹⁵⁴); cultivamos por 3 horas, células LK-35.2 con anti-CD40 o anti-CD11b, en presencia o ausencia de NaN₃. Al término, las células se fijaron, se tiñeron las MHCII y se analizaron en un microscopio confocal. En la figura 16, se observa que la redistribución en la membrana plasmática de las MHCII depende de la viabilidad celular; en células tratadas con anti-CD40 o el anticuerpo control al tiempo 0, la distribución de MHCII en la membrana plasmática fue similar y no se afectó por la presencia de NaN₃, mientras que ésta impidió la formación de cúmulos de MHCII en las células.



Horas en cultivo con los anticuerpos

MHC II

Figura 16 La redistribución de MHCII en superficie inducido por el estimulo a través de CD40, depende de la actividad celular. Células LK35.2 cultivadas por 3 h a 37°C en portaobjetos de vidrio con 10 μ g/mL anti-CD40 o anti-CD11b (control) con o sin 0.1% NaN₃. Al final del cultivo, se analizaron como en la figura 15. Cada panel contiene a la derecha la imagen en Nomarsky y a la izquierda tinción de MHCII. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

El estímulo a través de CD40 induce la formación de regiones enriquecidas en MHCII y CD80 en la membrana plasmática.

Considerando que el estímulo a través de CD40 induce redistribución de las MHCII en la membrana plasmática, evaluamos su efecto en la distribución de otras moléculas relacionadas con la presentación de antígeno, como CD80. Para esto, cultivamos células LK-35.2 con anti-CD40 o control en laminillas por 1, 3 y 24 horas y al finalizar se fijaron, se tiñeron con anti-MHCII (verde) y anti-CD80 (rojo) y se observaron en un microscopio confocal.

Como puede verse en la figura 17, en células cultivadas con anti-CD40, CD80 se redistribuyó con las MHCII, formando cúmulos en la membrana plasmática enriquecidos en ambas moléculas. De manera basal, CD80 colocalizó con las MHCII, siendo la expresión de la primera de menor intensidad que la segunda. Después de una hora de cultivo con anti-CD40 se observaron sitios en la membrana plasmática en donde se acumularon estas moléculas, los cuales fueron más evidentes a las 3 horas de activación. A las 24 horas de cultivo con anti-CD40, la expresión de CD80 en superficie se incrementó (correlacionando con la citometría de flujo, figura 9), y colocalizó completamente con las MHCII.

Estos resultados indican que CD80 se localiza en forma basal con las MHCII, y que después del estímulo a través de CD40, se redistribuyen ambas moléculas formando regiones en la membrana plasmática enriquecidas en ellas. La formación de regiones en la membrana plasmática enriquecidas en MHCII y CD80 podría ser un mecanismo mediante el cual se mejore la capacidad del linfocito B para activar al linfocito T CD4, ya que se estarían preformando en la membrana de la CPA estructuras moleculares que contienen el ligando del TCR (MHCII) como el de CD28 (CD80), ambas moléculas indispensables para la activación del linfocito T CD4.



Figura 17. La estimulación de linfocitos B a través de CD40 induce la formación de cúmulos enriquecidos en moléculas MHCII y CD80 en la membrana plasmática. Se cultivaron células LK-35.2 a 37°C en portaobjetos de vidrio en presencia de 10 μg/mL anti-CD40 o anti-CD11b (control), por los tiempos indicados. Al finalizar, las células se fijaron y tiñeron para MHCII (Alexa 488, verde) y CD80 (Rojo-Texas) y se observaron en un microscopio confocal con excitación/emisión a 540/590 y 488/540 para rojo y verde, respectivamente. Las imágenes (100x) se adquirieron a una resolución de 2048x2048 pixeles y se analizaron por medio del software LSM5 Image Examiner. Resultados de un experimento representativo de cuatro independientes.

El estímulo a través de CD40 induce balsas lipídicas clásicas enriquecidas en MHCII.

Considerando que la localización de MHCII en balsas lipidícas elementales disminuye el umbral de activación de los linfocitos T CD4¹⁵¹, decidimos determinar si los cúmulos o agregados de MHCII en la membrana plasmática

inducidos por la señalización a través de CD40, ocurrían en balsas lipídicas clásicas (enriquecidas en gangliósido GM-1 y dependientes de colesterol). Para esto, cultivamos células LK35.2 con anticuerpos anti-CD40 o control en laminillas, y a las 0, 3 y 24 horas de cultivo en algunos pozos se adicionó metil-β-ciclodextrina (M-βc). Después de 10 minutos de incubación M-βc, las células se lavaron, se fijaron, y se tiñeron con anti-MHC II (rojo) y con la subunidad B de la toxina de cólera marcada con Alexa 488 (verde), la cual se une al gangliósido GM-1, un marcador de balsas lipídicas clásicas.

La figura 18 muestra que el estímulo a través de CD40 induce acumulación de MHCII en balsas lipídicas clásicas. En condiciones basales las MHCII colocalizan con el gangliósido GM-1 en pequeños cúmulos dependientes de colesterol, que corresponden a las balsas lipídicas elementales o basales. Después de tres horas de estimulación con anti-CD40, se formaron grandes cúmulos de MHCII y GM-1 en la membrana plasmática; que fueron sensibles a la adición de M-βc, por lo que son dependientes de colesterol. A las 24 horas de cultivo con anti-CD40, las balsas lipídicas enriquecidas en MHCII no se eliminaron completamente por la adición de M-βc, sugiriendo una menor dependencia al colesterol. Esto, podría ser debido a que a estas balsas lipídicas estén integradas por otros elementos, como el citoesqueleto u otras proteínas reclutadas a los sitios de señalización, lo que podría disminuir su dependencia de colesterol.

Estos resultados indican que la formación de balsas lipídicas clásicas enriquecidas en MHCII, es inducida por el estímulo a través de CD40. Además, considerando que la desestabilización de estas balsas elimina el efecto temprano de CD40 en la función del linfocito B como CPA (Fig. 14), estas balsas representarían una opción por la cual CD40 mejora la eficiencia de la CPA para activar a linfocitos T CD4.



Figura 18 El estímulo a través de CD40 induce balsas lipídicas enriquecidas con moléculas MHCII Células LK35.2 se cultivaron a 37° C en portaobjetos de vidrio, en presencia de 10 µg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control), por los tiempos indicados en la figura. 10 minutos antes de finalizar los cultivos, se adicionó en algunos pozos, metil- β ciclodextrina (m- β C) a una concentración final de 10 mM. Al finalizar las incubaciones, las células fueron lavadas, fijadas y teñidas con anticuerpos anti-MHC-II-biotina, seguidas por estreptoavidina-Rojo Texas y toxina del cólera-Alexa 488 (gangliósido GM-1). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal, la fluorescencia se detectó simultáneamente con excitación/emisión a 540/590 y 488/540 nm para el Rojo-Texas y el Alexa 488, respectivamente. Las imágenes (100x) se adquirieron con una resolución de 1024 x 1024 pixeles y se analizaron por medio del software LSM5 Image Examiner (Carl Zeiss). Los resultados son representativos de dos experimentos.

El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA mediante la formación de balsas lipídicas enriquecidas por MHCII.

De acuerdo a nuestros resultados, el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de la CPA en una forma temprana y una tardía (Fig. 10). Además, este estímulo induce la formación de grandes balsas lipídicas que contienen MHCII (y probablemente CD80) y aumenta la expresión de CD80 en superficie. Para evaluar la relación entre estos efectos de la estimulación de CD40; se cultivaron células LK-35.2 con anti-CD40 o anticuerpo control por 3 y 24 horas. Diez minutos antes de finalizar el cultivo, se adicionó M-βc en algunos cultivos. Posteriormente, se evaluó la eficiencia de presentación de antígeno de estas células, y la expresión de CD80 y MHCII en superficie. Para el estudio de presentación de antígeno, las células LK-35.2 se fijaron, y cultivaron con los hibridomas E907.D (LG33-47) y TS12 (RNAasa A43-56), en presencia de sus péptidos respectivos.

Los resultados del estudio de presentación de antígeno indican que el estímulo a través de CD40 por tres horas, aumenta la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA mediante la formación de grandes balsas enriquecidas en MHCII (Fig. 19). En condiciones basales las células LK-35.2 cultivadas con anti-CD40 o el anticuerpo control presentaron similar capacidad para activar a los hibridomas de linfocitos T CD4; la cual prácticamente disminuyó a la mitad después del tratamiento con M- β c. Esto indica que las MHCII que se encuentran en las balsas lipídicas elementales o basales en la superficie de las células LK-35.2, son importantes en su función como CPA, confirmando los resultados descritos en la bibliografía¹⁵¹. Después de tres horas de cultivo con anticuerpos anti-CD40, las células LK-35.2 fueron de 1.6 a 2 veces más eficientes para activar a los hibridomas T E.907.D y TS12, que las células cultivadas con el anticuerpo control. Nuevamente, la M- β c disminuyó la capacidad de las células LK-35.2 para activar a los hibridomas; y además eliminó la diferencia entre los cultivos con

anti-CD40 y con anticuerpo control, indicando que las balsas lipídicas inducidas por anti-CD40 aumentan la eficiencia del linfocito B como CPA. En los cultivos de 24 horas, las células LK-35.2 estimuladas con anti-CD40 fueron de 1.6 a 4.5 veces más eficientes para activar a los hibridomas E907 y TS12 que las células control. En este caso, aunque el tratamiento con M-βc nuevamente disminuyó la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA, las células activadas con anti-CD40 fueron aún más eficientes para activar linfocitos T que con el anticuerpo control. Este efecto persistente de anti-CD40 podría ser debido a la mayor expresión de CD80 en la superficie (Fig. 6 y 18), o alternativamente y de manera no excluyente, a los microdominios que permanecieron resistentes al tratamiento con M-βc (Fig. 18).

En relación a los niveles de expresión en superficie de CD80 y MHCII, estos no se modificaron por el tratamiento con la M-βc (Fig. 19B), por lo que el efecto del tratamiento es debido a cambios en la distribución de las moléculas y no a cambios en sus niveles de expresión. Como en la figura 6, el estímulo a través de CD40 por 24 horas, aumentó en la superficie celular la expresión de CD80, pero no la de las MHCII; resultados similares se obtuvieron con células tratadas con M-βc.

En conclusión, los resultados indican que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA; lo cual es debido, inicialmente, a la formación de grandes balsas lipídicas clásicas enriquecidas en MHCII (y probablemente CD80); seguida de un aumento en la expresión de CD80 en superficie, la cual correlaciona positivamente con el máximo efecto de CD40 en la función del linfocito B como CPA.



Figura 19 Las balsas lipídicas enriquecidas con MHCII inducidas por la estimulación a través de CD40 aumentan la eficiencia del linfocito B como CPA Se cultivaron células LK35.2 en presencia de 10 µg/mL de anti-CD40 o anti-CD11b (control), por los tiempos indicados. 10 minutos antes de finalizar el cultivo, en algunos pozos se adicionó, M- β C a una concentracion final de 10 mM, después de lo cual las células se lavaron y se dividieron en dos grupos. A) Se fijaron las células y se utilizaron en un estudio de presentación de antígeno con los hibridomas E-907D o TS12 en presencia 0.3 µM del péptido LG33-47 o RNAasa A43-56, respectivamente. La determinación de IL-2 re realizó como se describe en material y métodos. Los resultados representan el promedio de los triplicados en cpm, indicando en barras el error estándar. B) Se tiñeron $2x10^5$ células LK-35.2 con anti-CD80-FITC y anti-MHCII-biotina, seguidos de estreptavidina-PE y se analizaron en un citómetro de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Discusión

Los linfocitos B son CPA que presentan antígenos a linfocitos T CD4 para obtener su cooperación y diferenciarse a células productoras de anticuerpos o linfocitos B de memoria; por lo que la eficiencia del linfocito B como CPA repercute en su función como célula efectora de la respuesta inmune humoral. CD40 es el principal estímulo que aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA^{213, 250}, lo cual se ha atribuído: al aumento en la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras y/o a cambios en el procesamiento de antígeno, sin embargo esto no se ha estudiado con detalle. En este trabajo confirmamos que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de linfocitos B como CPA lo que ocurre, al menos, por dos mecanismos alternos al procesamiento de antígeno; uno de ellos temprano, que es debido a la formación de balsas lipídicas enriquecidas en MHCII (y problamente CD80) y otro tardío que correlaciona positivamente con el aumento de CD80 en superficie. El primer mecanismo, previamente descrito como eficaz para activar linfocitos T CD4+, no había sido previamente relacionado con CD40 como inductor.

Estudios iniciales realiazados por el grupo de la Dra. Pierce, sugerían que el estímulo a través de CD40 aumentaba la eficiencia del linfocito como CPA, debido a cambios, no identificados en el procesamiento de antígeno²⁵³. Esta propuesta se originó al encontrar que el estímulo a través de CD40 aumentaba la eficiencia de presentación de péptidos derivados de una proteína y no de sus péptidos sintéticos; resultados que no coincide con los nuestros. Nosotros encontramos que el efecto de CD40 ocurre debido a cambios alternos al procesamiento de antígeno; y que además son independientes a características particulares de la CPA (por ej. expresión de DO, DM). De tal forma que el efecto de la ligación de CD40 ocurre con antígenos que tienen diferentes requerimientos en su procesamiento (ej: LG y la RNAasa A) y en células que no son CPA profesionales (ej: células LKK, línea derivada de fibroblastos). Adicionalmente, confirmamos la participación de cambios independientes al procesamiento de

antígeno por los estudios de presentación de antígeno con CPA fijadas y péptidos sintéticos (los cuales no necesitan ser degradados y se presentan sin requerir la actividad celular de la CPA). Sin embargo, aunque nuestros resultados señalan la participación de cambios alternos al procesamiento de antígeno, no descartan la participación de estos; los cuales podrían ser responsables del mayor efecto de la ligación de CD40 en las células LK-LG-KDEL (presenta péptidos de la LG con señal de retención en el RE, LG-KDEL).

A la fecha se desconoce cuales serían los cambios en el procesamiento de antígeno inducidos por la señalización de CD40; considerando que ésta induce la activación de PI3K y Rab7^{107, 254} (proteínas relacionadas con la vía endocítica), es probable que la ligación de CD40 induzca modificaciones en los compartimientos de la vía endocítica. Estas modificaciones podrían favorecer la formación de compartimientos tipo MIIC, semejante a los inducidos por el BCR^{255,} ²⁷⁴, o promover el transporte del antígeno hacia estos compartimientos. Una estrategia para esclarecer si la estimulación de CD40 induce modificaciones en el procesamiento de antígeno es mediante el análisis de los genes cuya expresión se modifica por la ligación de CD40, y que además codifican a proteínas relacionadas al procesamiento de antígeno. Así por ejemplo, se podría evaluar si la ligación de CD40 induce la expresión: de proteasas (catepsinas), de moléculas que regulan el transporte vesicular (PI3-K, Rab7, etc), y de moléculas accesorias al procesamiento de antígeno (HLA-DM, HLA-DO). Una vez seleccionadas las moléculas cuya expresión es modificada por la ligación de CD40, se estudiaría su relevancia en la función del linfocito B como CPA.

Adicionalmente a que la ligación de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA independientemente del procesamiento de antígeno, el efecto de CD40 ocurre en dos etapas secuenciales: una temprana y una tardía. La primera ocurre después de la ligación de CD40 por perídos cortos (30 min.-3 horas), y es independiente a cambios en los niveles de expresión en superficie de CD80, CD86, ICAM-1 y MHCII. Mientras que la segunda, correlaciona positivamente con

84

el aumento en la expresión de CD80. Estudios previos por otros grupos han señalado al aumento en la expresión de CD80 como un mecanismo por el cual la ligación de CD40 mejora la eficiencia del linfocito B como CPA²⁴⁸. De acuerdo a estos estudios, y que CD80 es el ligando de CD28 (molécula coestimuladora del linfocito T CD4), consideramos que el aumento en la expresión de CD80 en nuestro sistema, coopera en mejorar la eficiencia del linfocito B como CPA.

El aumento en la función del linfocito B como CPA debido a la ligación de CD40 por tiempos cortos, mejora su capacidad para activar a linfocitos T CD4 virgenes, sugiriendo su posible relevancia in vivo. Este efecto de CD40 depende de la actividad celular del linfocito B, y probablemente no requiere de la transcripción de genes, ya que ocurre rápidamente (30 minutos después de la ligación de CD40); además de que es dependiente de la presencia en la membrana plasmática de las balsas lipídicas clásicas, y de la activación de PKC. En relación a esta última, previos estudios habían vinculado la activación de PKC por la ligación de CD40²⁷⁵, sin embargo se desconocía su repercusión en la función de CPA del linfocito B. En este trabajo describimos que la activación de PKC por CD40 aumenta rápidamente la eficiencia del linfocito B como CPA; efecto que deberá ser estudiado con mayor profundidad para establecer su relevancia y su mecanismo de acción. Por otro lado, a diferencia de PKC, PI3-K parece no participar en el efecto temprano de CD40. Estudios previos han descrito que la señalización de CD40 origina la activación de PI3-K, la cual predominantemente, induce la síntesis de novo de proteínas¹⁰⁷; esto concuerda con que PI3-K no participe en el efecto temprano de CD40.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran la participación de las balsas lipídicas en el efecto de CD40. Las balsas lipídicas son importantes en la señalización de varios receptores inmunológicos¹⁴⁴, siendo CD40 uno de ellos. Se ha demostrado que CD40 inicia su señalización en balsas lipídicas, a donde recluta las proteínas que participan en su señalización como TRAF^{145, 146}. Adicionalmente, las balsas lipídicas enriquecidas en MHCII disminuyen el umbral

85

de activación de los linfocitos T CD4, y se ha propuesto pueden favorecer una respuesta Th1^{151, 152}. Sin embargo, aunque se había descrito que la distribución de MHCII en las balsas lipídicas afectaba su función como CPA, se desconocía como se regulaba esta distribución, lo cual es el principal hallazgo de este trabajo.

En este trabajo demostramos que el estímulo a través de CD40, induce la agregación de balsas lipídicas elementales que contienen MHCII (que se encuentran basalmente), formando cúmulos de gran tamaño, que aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA. Estos cúmulos de MHCII se forman rápidamente, siendo evidentes a las tres horas de activación con anti-CD40; periodo en el cual son dependientes de colesterol. Esta dependencia al colesterol disminuye al prolongar el tiempo de estimulación con anti-CD40, lo que puede ser debido a la integración de moléculas que estabilicen estos cúmulos; como moléculas del citoesqueleto y/o involucradas en la transducción de señales. Adicionalmente a MHCII, la ligación de CD40 también afecta la distribución de CD80, formando así cúmulos en la membrana plasmática enriquecidos en ambas moléculas. Considerando que en condiciones basales, en nuestro modelo, CD80 y MHCII se encuentran juntas, es probable que ambas se localizen en balsas lipídicas elementales, y que después de la ligación de CD40, ambas moléculas se distribuyan a las balsas lipídicas. Por otro lado, los cúmulos de MHCII inducidos por CD40, van siendo enriquecidos con CD80, cuya expresión aumenta tardíamente como consecuencia de la señalización de CD40.

La participación de las balsas lipídicas clásicas (dependientes de colesterol) se evaluó al desestabilizarlas mediante la adición de M-βC, la cual se ha descrito puede alterar la señalización intracelular. Sin embargo no creemos que este efecto de M-βC pueda ser importante en nuestro sistema, ya que ésta se adicionó 10 minutos antes de finalizar los cultivos con anti-CD40, por lo que previo a su adición la señalización de CD40 se mantuvo intacta. Apoyando lo anterior, la M-βC no afectó el aumento de CD80 inducido por la señalización de

CD40; por lo que el efecto de la M-βC en nuestro sistema, es debido predominantemente a la desestabilización de las balsas lipídicas clásicas y al cambio en la distribución de las moléculas que ahí se localizan.

De acuerdo a nuestros resultados, la formación de estas balsas lipídicas enriquecidas en MHCII requiere de la actividad celular de la CPA; sin embargo desconocemos los mecanismos que llevan a su formación. Al respecto, sugerimos los dos mecanismos siguientes, no excluyentes:

- 1. Redistribución de las MHCII/CD80 en la misma membrana plasmática.
- 2. Transporte intracelular de MHCII/CD80 de neosintésis o reciclaje a los microdominios.

El primer mecanismo podría iniciar la formación de estas balsas lipídicas, lo que se apoya en estudios que demuestran la colocalización de CD40 y MHCII en la membrana plasmática de linfocitos B¹⁵⁴. Considerando esto, el entrecruzamiento de CD40 con el anticuerpo podría reunir las balsas lipídicas elementales con CD40 y MHCII, para formar balsas lipídicas de mayor tamaño, que posiblemente son inestables y dependientes de colesterol. La señalización de CD40 en estas balsas inestables, podría favorecer el transporte de vesículas intracelulares enriquecidas en MHCII/CD80, lo que consolidaría a las balsas lipídicas. Apoyando a esto, se ha descrito en células dendríticas el transporte dirigido de MHCII a la sinapsis inmunológica²⁷⁶

Para determinar si los mecanismos anteriores participan en la formación de las balsas lipídicas inducidas por CD40, teñimos con anticuerpos marcados con fluorocromos las moléculas CD40 y MHCII de la membrana plasmática, sin embargo no logramos detectar señal de la primera, posiblemente por su baja expresión en superficie. Otra posibilidad para evaluar la participación de las moléculas en superficie y las que se encuentran en vesiculas intracelulares; es diferenciando a las primeras mediante un marcaje con biotina. Así, utilizando

estreptoavidina acoplada a un fluorocromo y un anticuerpo dirigido contra la molécula de interés, podríamos distinguir, mediante microscopía confocal, si las balsas lipídicas inducidas por CD40 se forman inicialmente por moléculas de la superficie celular (tinción predominantemente de estreptoavidina); y si posteriormente se integran a ellas moléculas que son transportadas desde compartimiento intracelulares (doble tinción). De esta manera podríamos estudiar a detalle la formación de las balsas lipídicas inducidas por CD40.

Con respecto a la función, las balsas lipídicas enriquecidas en MHCII y CD80, inducidas por la activación a través de CD40, aumentan la capacidad del linfocito B como CPA. Aunque desconocemos los mecanismos por lo cual esto ocurre, proponemos las siguientes opciones, no excluyentes:

- 1. Modificación de la señalización a través de las MHCII localizadas en balsas lipídicas en el linfocito B.
- 2. La respuesta del linfocito T CD4 a su reconocimiento.

Con respecto al primero, se ha descrito que la señalización de las MHCII es diferente dependiendo si se localiza o no en balsas lipídicas²⁵⁶, y aunque en linfocitos B se desconoce la repercusión funcional de esta señalización, se ha descrito que ésta favorece el reclutamiento de otras MHCII¹⁵⁸, lo que podría afectar su eficiencia como CPA. En relación a la segunda opción, se ha descrito que los linfocitos T disminuyen su umbral de respuesta cuando las MHCII se localizan en balsas lipídicas¹⁵¹, incluso se ha descrito que su localización en éstas podría favorecer una respuesta Th1, lo que sugiere fuertemente, una respuesta diferencial del linfocito CD4, en función de la localización de las MHCII en la membrana plasmática de la CPA¹⁵².

Considerando que en nuestro sistema experimental el papel de las balsas lipídicas clásicas enriquecidas por MHCII, se evaluó al deshacerlas (las MHCII y el gangliósido GM-1 se distribuyeron homogéneamente en la membrana plasmática) justo antes del contacto con el linfocito T, es probablemente que al menos un mecanismo por el cual las balsas lipídicas aumentan la capacidad del linfocito B como CPA, sea por la manera en que el linfocito T reconoce y responde a los complejos MHCII-péptido en la superficie del linfocito B; lo cual concuerda con que las CPA estimuladas a través de CD40 inducieran una mayor desregulación del TCR. De acuerdo a lo anterior, proponemos que la formación de cúmulos en la membrana plasmática enriquecidos en MHCII, aumentan la avidez de la interacción TCR-MHCII, disminuyendo el umbral de activación del linfocito T CD4. Esto sería válido, incluso cuando la mayoría de los complejos MHCII-péptido fueran inespecíficos, ya que estos complejos también participan en el reconocimiento del TCR⁹⁴.

Además de que estímulo a través de CD40 induce la formación de balsas lipídicas enriquecidas en MHCII, que posiblemente aumentan la avidez de la interacción TCR-MHCIIpéptido; este estímulo también favorece la agregación de CD80, formando estructuras enriquecidas en MHCII y CD80 (similar al SMAC). Estas estructuras podrían constituir un sitio óptimo en la membrana plasmática para activar al linfocito T CD4, ya que concentraría los ligandos del TCR y de CD28, que proporcionan la primera y segunda señal de activación del linfocito T CD4, respectivamente. De esta manera el estímulo a través de CD40 estaría contribuyendo a la formación de la sinapsis inmunológica en el extremo de la CPA, permitiendo que ésta tenga un papel activo en la sinapsis.

En el caso de los linfocitos B vírgenes, la señalización a través de CD40 por tiempos cortos es suficiente para aumentar su capacidad como CPA, lo que ocurre junto con una serie de cambios en la expresión de moléculas como MHCII, CD86, ICAM-1, y CD80; lo que hace difícil discernir cual de ellos, si no es que el conjunto, son los responsables del aumento en la capacidad del linfocito B como CPA. Por otro lado, es necesario estudiar si la ligación de CD40 en linfocitos B normales, induce la formación de balsas lipídicas enriquecidas en MHCII, y cual es su papel en la función del linfocito B como CPA; utilizando

linfocitos T CD4 virgenes o activados, para abarcar las diferentes posibilidades de interacciones *in vivo*.

Suponiendo que al igual que en LK-35.2, la ligación de CD40 en linfocitos B normales originara la formación de balsas lipídicas enriquecidas en MHCII; es probable que debido a la cinética de expresión de CD86 y CD80, estas balsas estén inicialmente enriquecidas en CD86; la cual sería sustituída, posteriormente, por CD80. Por otro lado, considerando que fenotipo de las células LK-35.2 es similar al de un linfocito B activado (que expresa MHCII, ICAM-1 y CD86 en superficie), es probable que las balsas lipídicas inducidas por CD40 pudieran ser relevantes, en condiciones en donde haya un estímulo previo al linfocito B que induzca un aumento en la expresión de sus moléculas en superficie, como podría ser el reconocimiento del antígeno por su BCR. De tal forma, proponemos el siguiente modelo secuencial de eventos:

a) El linfocito B reconoce el antígeno a través del BCR, lo que induce una mayor expresión de las MHCII y CD86 en superficie, y favorece la formación de complejos MHCII-péptido específico.

b) El linfocito T reconoce los complejos MHCII-péptido en el linfocito B e induce la expresión de CD154.

c) La interacción de CD154 en el linfocito T activado con CD40 en el linfocito B, induce la acumulación de MHCII y probablemente CD86 en balsas lipídicas, lo que aumenta la avidez de la interacción linfocitos T-CPA, generando señales adicionales en ambas. Simultáneamente, la interacción CD154-CD40, induce y/o mantiene la expresión de otras moléculas relevantes en la presentación de antígeno, favoreciendo la formación de la sinapsis inmunológica y la activación de ambas células.

Otra opción, más probable en la respuesta primaria, es que el linfocito T CD4 sea inicialmente activado por una célula dendrítica, por lo que cuando entra en contacto con el linfocito B ya expresa en su superficie CD154. Este linfocito reconoce complejos MHCII-péptido en el linfocito B (que reconocio al antígeno), al cual activa a través de CD40, induciendo todos los eventos mencionados.

Finalmente, este trabajo confirma que el estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia del linfocito B como CPA, lo cual es debido en parte a la agregación de MHCII y CD80 en balsas lipídicas, y probablemente al aumento en los niveles de la expresión de CD80 en superficie.

Conclusiones

El estímulo a través de CD40 aumenta la eficiencia de linfocitos B como CPA debido a los siguientes cambios independientes al procesamiento de antígeno:

1.- Agregación de MHCII y CD80 en balsas lipídicas.

2.- Aumento en los niveles de expresión de CD80 en superficie.

El primero es responsable del efecto inicial o temprano de la ligación de CD40 en la función del linfocito B como CPA; función que es mejorada al incrementarse los niveles de CD80 en superficie.

El hallazgo de que la señalización de CD40 induce la formación de agregados de MHCII en balsas lipídicas permite entender con mayor claridad como el estímulo a través de CD40 mejora la función del linfocito B como CPA; originando nuevas preguntas sobre el mecanismo de formación de estas balsas, la vía de transducción de señales involucradas, y principalmente la formación, composición y relevancia de estas balsas en linfocitos B normales, considerando los diferentes escenarios *in vivo*.

Finalmente, el conocimiento de los cambios que mejoran la función de la CPA para activar a linfocitos T CD4, podría permitir en un futuro regular la respuesta inmunológica, ya sea induciéndola como es el objetivo de las vacunas, o inhibiéndola como ocurre en procesos autoinmunes y transplantes.

Referencias

- 1. Bromley,S.K. *et al.* The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375-396 (2001).
- 2. Friedl,P., den Boer,A.T., & Gunzer,M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 532-545 (2005).
- 3. Hart, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287 (1997).
- 4. Banchereau, J. *et al.* The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 881-922 (1994).
- 5. Germain, R.N. & Margulies, D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 403-450 (1993).
- 6. Castellino, F., Zhong, G., & Germain, R.N. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.* **54**, 159-169 (1997).
- 7. Cresswell,P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259-293 (1994).
- 8. Mellman,I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575-625 (1996).
- 9. Riezman,H., Woodman,P.G., van,M.G., & Marsh,M. Molecular mechanisms of endocytosis. *Cell* **91**, 731-738 (1997).
- 10. Somsel,R.J. & Wandinger-Ness,A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* **113 Pt 2**, 183-192 (2000).
- 11. Jahn,R., Lang,T., & Sudhof,T.C. Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533 (2003).
- 12. Geuze,H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* **19**, 282-287 (1998).
- 13. Pierre, P. & Mellman, I. Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr Opin Immunol* **10**, 145-153 (1998).

- 14. Calafat, J. *et al.* Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J Cell Biol* **126**, 967-977 (1994).
- 15. Kleijmeer,M.J., Morkowski,S., Griffith,J.M., Rudensky,A.Y., & Geuze,H.J. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol* **139**, 639-649 (1997).
- 16. Peters, P.J. *et al.* Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med* **182**, 325-334 (1995).
- 17. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 821-850 (1997).
- 18. Villadangos, J.A. *et al.* Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* **172**, 109-120 (1999).
- 19. Turk, V., Turk, B., & Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* **20**, 4629-4633 (2001).
- 20. Manoury, B. *et al.* An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* **396**, 695-699 (1998).
- 21. Antoniou,A.N., Blackwood,S.L., Mazzeo,D., & Watts,C. Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity.* **12**, 391-398 (2000).
- 22. Villadangos, J.A. & Ploegh, H.L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity.* **12**, 233-239 (2000).
- 23. Maric, M. *et al.* Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* **294**, 1361-1365 (2001).
- 24. Riese, R.J. & Chapman, H.A. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **12**, 107-113 (2000).
- 25. Honey,K. & Rudensky,A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 472-482 (2003).
- 26. Hsieh,C.S., deRoos,P., Honey,K., Beers,C., & Rudensky,A.Y. A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J. Immunol.* **168**, 2618-2625 (2002).
- 27. Watts,C., Matthews,S.P., Mazzeo,D., Manoury,B., & Moss,C.X. Asparaginyl endopeptidase: case history of a class II MHC compartment protease. *Immunol. Rev.* **207**, 218-228 (2005).
- 28. Pieters, J. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol.* **75**, 159-208 (2000).

- 29. Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., & Geuze, H.J. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**, 669-676 (1991).
- 30. McCormick, P.J., Martina, J.A., & Bonifacino, J.S. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 7910-7915 (2005).
- 31. Hiltbold, E.M. & Roche, P.A. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 30-35 (2002).
- 32. Villadangos, J.A. *et al.* Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **172**, 109-120 (1999).
- 33. Blum,J.S. & Cresswell,P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 3975-3979 (1988).
- 34. Manoury,B. *et al.* Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity.* **18**, 489-498 (2003).
- 35. Amigorena, S. *et al.* Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* **181**, 1729-1741 (1995).
- 36. Cresswell, P. & Lanzavecchia, A. Antigen processing and recognition. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 11-12 (2001).
- 37. Maric,M.A., Taylor,M.D., & Blum,J.S. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2171-2175 (1994).
- 38. Nakagawa, T. *et al.* Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
- 39. Shi,G.P. *et al.* Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* **191**, 1177-1186 (2000).
- 40. Riese, R.J. *et al.* Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357-366 (1996).
- 41. Nakagawa,T.Y. & Rudensky,A.Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **172**, 121-129 (1999).
- 42. Nakagawa,T.Y. *et al.* Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* **10**, 207-217 (1999).

- 43. Nakagawa,T.Y. & Rudensky,A.Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **172**, 121-129 (1999).
- 44. Shi,G.P. *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206 (1999).
- 45. Riese, R.J. *et al.* Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* **101**, 2351-2363 (1998).
- 46. Sanderson, F. *et al.* Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**, 1566-1569 (1994).
- 47. Lindstedt,R., Liljedahl,M., Peleraux,A., Peterson,P.A., & Karlsson,L. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* **3**, 561-572 (1995).
- 48. Kropshofer,H., Arndt,S.O., Moldenhauer,G., Hammerling,G.J., & Vogt,A.B. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity*. **6**, 293-302 (1997).
- 49. Kelly,A.P., Monaco,J.J., Cho,S.G., & Trowsdale,J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* **353**, 571-573 (1991).
- 50. Cho,S.G., Attaya,M., & Monaco,J.J. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* **353**, 573-576 (1991).
- 51. Arndt,S.O. *et al.* Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* **19**, 1241-1251 (2000).
- 52. Denzin,L.K. & Cresswell,P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, 155-165 (1995).
- 53. Denzin,L.K., Hammond,C., & Cresswell,P. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* **184**, 2153-2165 (1996).
- 54. Kropshofer,H. *et al.* Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* **15**, 6144-6154 (1996).
- 55. Arndt,S.O., Vogt,A.B., Hammerling,G.J., & Kropshofer,H. Selection of the MHC class II-associated peptide repertoire by HLA-DM. *Immunol. Res.* **16**, 261-272 (1997).
- 56. Morris, P. *et al.* An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* **368**, 551-554 (1994).
- 57. Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H.J., & Kleijmeer, M.J. MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic.* **3**, 894-905 (2002).

- 58. Murk,J.L. *et al.* Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13332-13337 (2003).
- 59. Murk,J.L. *et al.* 3-D Structure of multilaminar lysosomes in antigen presenting cells reveals trapping of MHC II on the internal membranes. *Traffic.* **5**, 936-945 (2004).
- 60. Hammond, C. *et al.* The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol* **161**, 3282-3291 (1998).
- 61. van,L.M. *et al.* Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J. Immunol.* **167**, 884-892 (2001).
- 62. Kleijmeer, M. *et al.* Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* **155**, 53-63 (2001).
- 63. Zwart,W. *et al.* Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity* **22**, 221-233 (2005).
- 64. Inaba,K. *et al.* The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* **191**, 927-936 (2000).
- 65. Aicher, A. *et al.* Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.* **164**, 4689-4696 (2000).
- 66. Chow,A., Toomre,D., Garrett,W., & Mellman,I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**, 988-994 (2002).
- 67. Bertho, N. *et al.* Requirements for T cell-polarized tubulation of class II+ compartments in dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 5689-5696 (2003).
- 68. Boes,M. *et al.* T cells induce extended class II MHC compartments in dendritic cells in a Toll-like receptor-dependent manner. *J. Immunol.* **171**, 4081-4088 (2003).
- 69. Raposo,G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**, 1161-1172 (1996).
- 70. Segura, E. *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* **106**, 216-223 (2005).
- 71. Wubbolts, R. *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cellderived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 10963-10972 (2003).

- 72. Wubbolts,R. *et al.* Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 6)**, 785-795 (1999).
- 73. Balamuth,F., Leitenberg,D., Unternaehrer,J., Mellman,I., & Bottomly,K. Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells. *Immunity.* **15**, 729-738 (2001).
- 74. Maldonado,R.A., Irvine,D.J., Schreiber,R., & Glimcher,L.H. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* **431**, 527-532 (2004).
- 75. Setterblad, N., Becart, S., Charron, D., & Mooney, N. B cell lipid rafts regulate both peptide-dependent and peptide-independent APC-T cell interaction. *J. Immunol.* **173**, 1876-1886 (2004).
- 76. Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 116-126 (2002).
- 77. Krummel,M.F. & Davis,M.M. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 66-74 (2002).
- 78. Jacobelli, J., Andres, P.G., Boisvert, J., & Krummel, M.F. New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 345-352 (2004).
- 79. Lee,K.H. *et al.* The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**, 1218-1222 (2003).
- 80. Sedwick, C.E. *et al.* TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J. Immunol.* **162**, 1367-1375 (1999).
- 81. Badour,K. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity.* **18**, 141-154 (2003).
- 82. Wulfing,C., Sjaastad,M.D., & Davis,M.M. Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 6302-6307 (1998).
- 83. Krogsgaard,M., Huppa,J.B., Purbhoo,M.A., & Davis,M.M. Linking molecular and cellular events in T-cell activation and synapse formation. *Semin. Immunol.* **15**, 307-315 (2003).
- 84. Bunnell,S.C. *et al.* T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J. Cell Biol.* **158**, 1263-1275 (2002).

- 85. Boerth,N.J. *et al.* Recruitment of SLP-76 to the membrane and glycolipidenriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **192**, 1047-1058 (2000).
- 86. Bi,K. *et al.* Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 556-563 (2001).
- 87. Zhang,W., Trible,R.P., & Samelson,L.E. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity.* **9**, 239-246 (1998).
- 88. Kuhne, M.R. *et al.* Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J. Immunol.* **171**, 860-866 (2003).
- 89. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973-983 (2003).
- 90. Boisvert, J., Edmondson, S., & Krummel, M.F. Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites. *J. Immunol.* **173**, 3647-3652 (2004).
- 91. Johnson,K.G., Bromley,S.K., Dustin,M.L., & Thomas,M.L. A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 10138-10143 (2000).
- 92. Krummel,M.F., Sjaastad,M.D., Wulfing,C., & Davis,M.M. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* **289**, 1349-1352 (2000).
- 93. Sperling,A.I. *et al.* TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J. Immunol.* **161**, 6459-6462 (1998).
- 94. Wulfing, C. *et al.* Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat. Immunol.* **3**, 42-47 (2002).
- 95. Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., & Davis, M.M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845-849 (2002).
- 96. Hiltbold,E.M., Poloso,N.J., & Roche,P.A. MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* **170**, 1329-1338 (2003).
- 97. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
- 98. Kroczek, R.A., Mages, H.W., & Hutloff, A. Emerging paradigms of T-cell costimulation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 321-327 (2004).

- 99. Chambers, C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.* **22**, 217-223 (2001).
- 100. Croft,M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 609-620 (2003).
- 101. Pentcheva-Hoang,T., Egen,J.G., Wojnoonski,K., & Allison,J.P. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* **21**, 401-413 (2004).
- 102. McAdam,A.J. *et al.* Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J. Immunol.* **165**, 5035-5040 (2000).
- 103. Alegre, M.L. *et al.* Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J. Immunol.* **157**, 4762-4770 (1996).
- 104. Alegre, M.L. *et al.* Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J. Immunol.* **157**, 4762-4770 (1996).
- 105. Futagawa, T. *et al.* Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 275-286 (2002).
- 106. Liang,L., Porter,E.M., & Sha,W.C. Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J. Exp. Med.* **196**, 97-108 (2002).
- 107. Dadgostar,H. *et al.* Cooperation of multiple signaling pathways in CD40regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1497-1502 (2002).
- 108. Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266 (1999).
- 109. McAdam,A.J. *et al.* ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102-105 (2001).
- 110. Darlington,P.J. *et al.* Surface cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 partitions within lipid rafts and relocates to the immunological synapse under conditions of inhibition of T cell activation. *J. Exp. Med.* **195**, 1337-1347 (2002).
- 111. Rudd,C.E. & Schneider,H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 544-556 (2003).
- 112. Collins, A.V. *et al.* The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* **17**, 201-210 (2002).

- 113. al-Alwan,M.M., Rowden,G., Lee,T.D., & West,K.A. The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol.* **166**, 1452-1456 (2001).
- 114. Wulfing, C. & Davis, M.M. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**, 2266-2269 (1998).
- 115. Acuto,O. & Cantrell,D. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 165-184 (2000).
- 116. Faure, S. *et al.* ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat. Immunol.* **5**, 272-279 (2004).
- 117. Dupre,L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity.* **17**, 157-166 (2002).
- 118. Krawczyk,C. *et al.* Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptidespecific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity.* **16**, 331-343 (2002).
- 119. Villalba, M. *et al.* Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J. Cell Biol.* **155**, 331-338 (2001).
- 120. Boniface, J.J. *et al.* Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity.* **9**, 459-466 (1998).
- 121. Tskvitaria-Fuller,I., Rozelle,A.L., Yin,H.L., & Wulfing,C. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J. Immunol.* **171**, 2287-2295 (2003).
- 122. Janes, P.W., Ley, S.C., & Magee, A.I. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**, 447-461 (1999).
- 123. Tavano, R. *et al.* CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. *J Immunol* **173**, 5392-5397 (2004).
- 124. Martin, M., Schneider, H., Azouz, A., & Rudd, C.E. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* **194**, 1675-1681 (2001).
- 125. Das,V. *et al.* Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity.* **20**, 577-588 (2004).
- 126. Viola,A., Schroeder,S., Sakakibara,Y., & Lanzavecchia,A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**, 680-682 (1999).

- 127. Dykstra,M., Cherukuri,A., Sohn,H.W., Tzeng,S.J., & Pierce,S.K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457-481 (2003).
- 128. Pizzo, P. *et al.* Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett* **91**, 3-9 (2004).
- 129. Anderson, R.G. & Jacobson, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821-1825 (2002).
- 130. Brown,D.A. & London,E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111-136 (1998).
- 131. Brown,D.A. & Rose,J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipidenriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544 (1992).
- 132. Maxfield, F.R. Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 483-487 (2002).
- 133. Varma, R. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801 (1998).
- 134. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., & Tsien, R.Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916 (2002).
- 135. Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., & Horber, J.K. Sphingolipidcholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997-1008 (2000).
- 136. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**, 929-942 (1998).
- 137. Vogt,A.B., Spindeldreher,S., & Kropshofer,H. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol. Rev.* **189**, 136-151 (2002).
- 138. van,M.G. Cell biology. The different hues of lipid rafts. *Science* **296**, 855-857 (2002).
- 139. Melkonian,K.A., Ostermeyer,A.G., Chen,J.Z., Roth,M.G., & Brown,D.A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910-3917 (1999).
- 140. Kropshofer,H. *et al.* Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat. Immunol.* **3**, 61-68 (2002).

- 141. Parolini, I. *et al.* Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* **274**, 14176-14187 (1999).
- 142. Harder, T. Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 353-359 (2004).
- 143. Drevot, P. *et al.* TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* **21**, 1899-1908 (2002).
- 144. Dykstra,M., Cherukuri,A., & Pierce,S.K. Rafts and synapses in the spatial organization of immune cell signaling receptors. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 699-707 (2001).
- 145. Hostager,B.S., Catlett,I.M., & Bishop,G.A. Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15392-15398 (2000).
- 146. Vidalain, P.O. *et al.* CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* **19**, 3304-3313 (2000).
- 147. Jury,E.C., Kabouridis,P.S., Flores-Borja,F., Mageed,R.A., & Isenberg,D.A. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* **113**, 1176-1187 (2004).
- 148. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., & Seed, B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*. **8**, 723-732 (1998).
- 149. Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L., & Ley, S.C. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 954-963 (2000).
- 150. Stoffel,B., Bauer,P., Nix,M., Deres,K., & Stoffel,W. Ceramide-independent CD28 and TCR signaling but reduced IL-2 secretion in T cells of acid sphingomyelinase-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **28**, 874-880 (1998).
- 151. Anderson,H.A., Hiltbold,E.M., & Roche,P.A. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* **1**, 156-162 (2000).
- 152. Buatois, V. *et al.* MHC class II-peptide complexes in dendritic cell lipid microdomains initiate the CD4 Th1 phenotype. *J. Immunol.* **171**, 5812-5819 (2003).
- 153. Bouillon, M. *et al.* Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules. *J. Biol. Chem.* **278**, 7099-7107 (2003).

- 154. Leveille,C., Chandad,F., Al-Daccak,R., & Mourad,W. CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3516-3526 (1999).
- 155. Turley,S.J. *et al.* Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**, 522-527 (2000).
- 156. Meyer zum Bueschenfelde, C.O., Unternaehrer, J., Mellman, I., & Bottomly, K. Regulated recruitment of MHC class II and costimulatory molecules to lipid rafts in dendritic cells. *J Immunol* **173**, 6119-6124 (2004).
- 157. Poloso,N.J., Muntasell,A., & Roche,P.A. MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport. *J Immunol* **173**, 4539-4546 (2004).
- 158. Setterblad,N., Becart,S., Charron,D., & Mooney,N. Signalling via MHC class II molecules modifies the composition of GEMs in APC. *Scand. J. Immunol.* **54**, 87-92 (2001).
- 159. Becart, S. *et al.* Intracytoplasmic domains of MHC class II molecules are essential for lipid-raft-dependent signaling. *J Cell Sci* **116**, 2565-2575 (2003).
- 160. Epstein, M.M., Di, R.F., Jankovic, D., Sher, A., & Matzinger, P. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* **182**, 915-922 (1995).
- 161. Ronchese, F. & Hausmann, B. B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **177**, 679-690 (1993).
- 162. Jaiswal,A.I. & Croft,M. CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response. *J. Immunol.* **159**, 2282-2291 (1997).
- 163. Constant,S.L. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. *J. Immunol.* **162**, 5695-5703 (1999).
- 164. Rodriguez-Pinto, D. & Moreno, J. B cells can prime naive CD4(+) T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner [In Process Citation]. *Eur J Immunol* **35**, 1097-1105 (2005).
- 165. Clark,M.R., Massenburg,D., Siemasko,K., Hou,P., & Zhang,M. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 382-387 (2004).
- 166. Siemasko,K. & Clark,M.R. The control and facilitation of MHC class II antigen processing by the BCR. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 32-36 (2001).
- 167. Drake, J.R., Webster, P., Cambier, J.C., & Mellman, I. Delivery of B cell receptor-internalized antigen to endosomes and class II vesicles. *J. Exp. Med.* **186**, 1299-1306 (1997).

- 168. Batista, F.D. & Neuberger, M.S. Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity.* **8**, 751-759 (1998).
- Lankar, D. *et al.* Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. *J. Exp. Med.* 195, 461-472 (2002).
- 170. Liljedahl,M. *et al.* Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* **8**, 233-243 (1998).
- 171. Denzin,L.K., Sant'Angelo,D.B., Hammond,C., Surman,M.J., & Cresswell,P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* **278**, 106-109 (1997).
- 172. Alfonso, C. *et al.* The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* **172**, 255-266 (1999).
- 173. Clark,L.B., Foy,T.M., & Noelle,R.J. CD40 and its ligand. *Adv. Immunol.* **63**, 43-78 (1996).
- 174. Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P.J., Wykes, M., & Waldmann, H. Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1751-1756 (2001).
- 175. Contin,C. *et al.* Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* **278**, 32801-32809 (2003).
- 176. Caux, C. *et al.* Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. *J. Exp. Med.* **180**, 1263-1272 (1994).
- 177. Alderson, M.R. *et al.* CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* **178**, 669-674 (1993).
- 178. Stamenkovic, I., Clark, E.A., & Seed, B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* **8**, 1403-1410 (1989).
- 179. Schonbeck,U. & Libby,P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58, 4-3 (2001).
- 180. Lederman, S. *et al.* Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.* **175**, 1091-1101 (1992).
- 181. Lee,B.O., Haynes,L., Eaton,S.M., Swain,S.L., & Randall,T.D. The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40

ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *J. Exp. Med.* **196**, 693-704 (2002).

- 182. Jaiswal,A.I., Dubey,C., Swain,S.L., & Croft,M. Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals. *Int. Immunol.* **8**, 275-285 (1996).
- 183. Lindgren,H., Axcrona,K., & Leanderson,T. 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**, 4578-4585 (2001).
- 184. Chan,F.K. *et al.* A domain in TNF receptors that mediates ligandindependent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354 (2000).
- 185. Siegel, R.M. *et al.* Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-2357 (2000).
- 186. Hu,H.M., O'Rourke,K., Boguski,M.S., & Dixit,V.M. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* **269**, 30069-30072 (1994).
- 187. Lee,H.H. *et al.* Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1421-1426 (1999).
- 188. Baccam,M., Woo,S.Y., Vinson,C., & Bishop,G.A. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP. *J. Immunol.* **170**, 3099-3108 (2003).
- 189. Jalukar,S.V., Hostager,B.S., & Bishop,G.A. Characterization of the roles of TNF receptor-associated factor 6 in CD40-mediated B lymphocyte effector functions. *J. Immunol.* **164**, 623-630 (2000).
- 190. Ahonen, C. *et al.* The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* **3**, 451-456 (2002).
- 191. Ishida, T. *et al.* Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* **271**, 28745-28748 (1996).
- 192. Ishida,T.K. *et al.* TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptorassociated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9437-9442 (1996).
- Sutherland,C.L., Heath,A.W., Pelech,S.L., Young,P.R., & Gold,M.R. Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J. Immunol.* **157**, 3381-3390 (1996).

- 194. Craxton, A. *et al.* p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 3225-3236 (1998).
- 195. Berberich, I. *et al.* Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J.* **15**, 92-101 (1996).
- 196. Berberich, I., Shu, G.L., & Clark, E.A. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J. Immunol.* **153**, 4357-4366 (1994).
- 197. DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., & de Saint, B.G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 541-543 (1993).
- 198. Allen,R.C. *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990-993 (1993).
- 199. Aruffo, A. *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* **72**, 291-300 (1993).
- 200. Grewal, I.S. & Flavell, R.A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 111-135 (1998).
- 201. Grewal,I.S. & Flavell,R.A. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol. Today* **17**, 410-414 (1996).
- 202. Callard,R.E., Armitage,R.J., Fanslow,W.C., & Spriggs,M.K. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol. Today* **14**, 559-564 (1993).
- 203. Grewal, I.S., Xu, J., & Flavell, R.A. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* **378**, 617-620 (1995).
- 204. Kamanaka, M. *et al.* Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity*. **4**, 275-281 (1996).
- 205. Kawabe, T. *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* **1**, 167-178 (1994).
- 206. Aicher, A. *et al.* Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J. Immunol.* **163**, 5786-5795 (1999).
- 207. Fecteau, J.F. & Neron, S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J. Immunol.* **171**, 4621-4629 (2003).
- 208. Bullock,T.N. & Yagita,H. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol* **174**, 710-717 (2005).
- 209. Cella,M. *et al.* 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**, 747-752 (1996).
- 210. Ridge, J.P., Di, R.F., & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478 (1998).
- 211. Bennett,S.R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
- 212. Smith,C.M. *et al.* Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 1143-1148 (2004).
- 213. van,K.C. & Banchereau,J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 330-337 (1997).
- 214. Wagner, D.H., Jr., Stout, R.D., & Suttles, J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3148-3154 (1994).
- 215. Kiener, P.A. *et al.* Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J. Immunol.* **155**, 4917-4925 (1995).
- 216. Tao,X. & Stout,R.D. T cell-mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. Requirements for macrophage activation by plasma membranes isolated from T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2916-2921 (1993).
- 217. Stout,R.D. & Suttles,J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* **17**, 487-492 (1996).
- 218. Stout,R.D., Suttles,J., Xu,J., Grewal,I.S., & Flavell,R.A. Impaired T cellmediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol.* **156**, 8-11 (1996).
- 219. Campbell,K.A. *et al.* CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major. *Immunity.* **4**, 283-289 (1996).
- 220. Poudrier, J. & Owens, T. CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. *J. Exp. Med.* **179**, 1417-1427 (1994).

- 221. Wheeler,K., Pound,J.D., Gordon,J., & Jefferis,R. Engagement of CD40 lowers the threshold for activation of resting B cells via antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1165-1168 (1993).
- 222. Bishop,G.A., Warren,W.D., & Berton,M.T. Signaling via major histocompatibility complex class II molecules and antigen receptors enhances the B cell response to gp39/CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1230-1238 (1995).
- 223. Maliszewski,C.R. *et al.* Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1044-1049 (1993).
- 224. Armitage,R.J., Macduff,B.M., Spriggs,M.K., & Fanslow,W.C. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.* **150**, 3671-3680 (1993).
- 225. Spriggs,M.K. *et al.* Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J. Exp. Med.* **176**, 1543-1550 (1992).
- 226. Rousset, F., Garcia, E., & Banchereau, J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J. Exp. Med.* **173**, 705-710 (1991).
- 227. Xu,J. *et al.* Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity.* **1**, 423-431 (1994).
- 228. Renshaw,B.R. *et al.* Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1889-1900 (1994).
- Facchetti,F., Appiani,C., Salvi,L., Levy,J., & Notarangelo,L.D. 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**, 6624-6633 (1995).
- 230. Rathmell,J.C., Townsend,S.E., Xu,J.C., Flavell,R.A., & Goodnow,C.C. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for. *Cell* **87**, 319-329 (1996).
- 231. Randall,T.D. *et al.* Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity.* **8**, 733-742 (1998).
- 232. Armitage,R.J. *et al.* CD40L: a multi-functional ligand. *Semin. Immunol.* **5**, 401-412 (1993).
- 233. Pene, J. *et al.* Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J. Immunol.* **172**, 5154-5157 (2004).

- 234. Laman, J.D., Claassen, E., & Noelle, R.J. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Crit Rev. Immunol.* **16**, 59-108 (1996).
- 235. Malisan, F. *et al.* Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**, 937-947 (1996).
- 236. Jabara,H.H., Fu,S.M., Geha,R.S., & Vercelli,D. 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**, 1861-1864 (1990).
- 237. Gascan,H., Gauchat,J.F., Aversa,G., Van,V.P., & de Vries,J.E. 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**, 8-13 (1991).
- 238. Nakanishi,K. *et al.* IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *Int. Immunol.* **8**, 791-798 (1996).
- 239. Fujieda,S., Zhang,K., & Saxon,A. 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**, 2318-2328 (1995).
- 240. Defrance, T. *et al.* Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* **175**, 671-682 (1992).
- 241. Ozaki,K. *et al.* A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **298**, 1630-1634 (2002).
- 242. Hasbold,J., Johnson-Leger,C., Atkins,C.J., Clark,E.A., & Klaus,G.G. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1835-1842 (1994).
- 243. Garrone, P. *et al.* Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1265-1273 (1995).
- 244. Barrett, T.B., Shu, G., & Clark, E.A. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J. Immunol.* **146**, 1722-1729 (1991).
- 245. Kansas,G.S. & Tedder,T.F. Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Immunol.* **147**, 4094-4102 (1991).

- 246. Flores-Romo,L., Estoppey,D., & Bacon,K.B. Anti-CD40 antibody stimulates the VLA-4-dependent adhesion of normal and LFA-1-deficient B cells to endothelium. *Immunology* **79**, 445-451 (1993).
- 247. Guo,Y. *et al.* Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J. Exp. Med.* **184**, 955-961 (1996).
- 248. Ranheim, E.A. & Kipps, T.J. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med.* **177**, 925-935 (1993).
- 249. Yellin,M.J. *et al.* T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. *J. Immunol.* **153**, 666-674 (1994).
- 250. Ozaki,M.E. *et al.* CD4+ T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs. *J. Immunol.* **163**, 5250-5256 (1999).
- 251. Evans, D.E., Munks, M.W., Purkerson, J.M., & Parker, D.C. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* **164**, 688-697 (2000).
- 252. Moy,V.T. & Brian,A.A. Signaling by lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) in B cells: enhanced antigen presentation after stimulation through LFA-1. *J. Exp. Med.* **175**, 1-7 (1992).
- 253. Faassen,A.E., Dalke,D.P., Berton,M.T., Warren,W.D., & Pierce,S.K. CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3249-3255 (1995).
- 254. Bertram,E.M., Hawley,R.G., & Watts,T.H. Overexpression of rab7 enhances the kinetics of antigen processing and presentation with MHC class II molecules in B cells. *Int Immunol* **14**, 309-318 (2002).
- 255. Siemasko,K., Eisfelder,B.J., Williamson,E., Kabak,S., & Clark,M.R. Cutting edge: signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J. Immunol.* **160**, 5203-5208 (1998).
- 256. Huby,R.D., Dearman,R.J., & Kimber,I. Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **274**, 22591-22596 (1999).
- Lemke,H., Hammerling,G.J., & Hammerling,U. Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 47, 175-206 (1979).

- 258. Heath,A.W., Wu,W.W., & Howard,M.C. Monoclonal antibodies to murine CD40 define two distinct functional epitopes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1828-1834 (1994).
- 259. Kappler, J., White, J., Wegmann, D., Mustain, E., & Marrack, P. Antigen presentation by Ia+ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 3604-3607 (1982).
- 260. Adorini, L. *et al.* Processing of endogenously synthesized hen egg-white lysozyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not identical set of epitopes recognized by class II-restricted T cells. *J. Immunol.* **151**, 3576-3586 (1993).
- 261. Munro,S. & Pelham,H.R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907 (1987).
- 262. Brooks,A.G. & McCluskey,J. Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. *J. Immunol.* **150**, 3690-3697 (1993).
- 263. Adorini,L. *et al.* Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **174**, 945-948 (1991).
- 264. Allen, P.M., McKean, D.J., Beck, B.N., Sheffield, J., & Glimcher, L.H. Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. *J. Exp. Med.* **162**, 1264-1274 (1985).
- 265. Moreno, J., Adorini, L., & Hammerling, G.J. Co-dominant restriction by a mixed-haplotype I-A molecule (alpha k beta b) for the lysozyme peptide 52-61 in H-2k x H-2b F1 mice. *J. Immunol.* **144**, 3296-3304 (1990).
- 266. Lorenz, R.G., Tyler, A.N., & Allen, P.M. T cell recognition of bovine ribonuclease. Self/non-self discrimination at the level of binding to the I-Ak molecule. *J. Immunol.* **141**, 4124-4128 (1988).
- 267. Ho,W.Y., Cooke,M.P., Goodnow,C.C., & Davis,M.M. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **179**, 1539-1549 (1994).
- 268. Bonifaz,L.C., Arzate,S., & Moreno,J. Endogenous and exogenous forms of the same antigen are processed from different pools to bind MHC class II molecules in endocytic compartments. *Eur. J. Immunol.* **29**, 119-131 (1999).
- 269. Moreno, J. *et al.* Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J. Immunol.* **147**, 3306-3313 (1991).

- 270. Nadimi,F. *et al.* Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1255-1263 (1991).
- 271. Escola,J.M., Grivel,J.C., Chavrier,P., & Gorvel,J.P. Different endocytic compartments are involved in the tight association of class II molecules with processed hen egg lysozyme and ribonuclease A in B cells. *J. Cell Sci.* **108** (**Pt 6**), 2337-2345 (1995).
- Valitutti,S., Muller,S., Salio,M., & Lanzavecchia,A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.* 185, 1859-1864 (1997).
- 273. Lauritsen, J.P. *et al.* Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J. Immunol.* **161**, 260-267 (1998).
- 274. Granboulan, M., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C., & Hivroz, C. Phosphoinositide 3-kinase activation by Igbeta controls de novo formation of an antigen-processing compartment. *J. Biol. Chem.* **278**, 4331-4338 (2003).
- 275. Schonbeck,U., Mach,F., & Libby,P. CD154 (CD40 ligand) [In Process Citation]. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 687-693 (2000).
- 276. Boes,M. *et al.* T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* **418**, 983-988 (2002).

CD40-Induced Aggregation of MHC Class II and CD80 on the Cell Surface Leads to an Early Enhancement in Antigen Presentation¹

Abigail Clatza,* Laura C. Bonifaz,* Dario A. A. Vignali,[†] and José Moreno²*

Ligation of CD40 on B cells increases their ability to present Ag and to activate MHC class II (MHC-II)-restricted T cells. How this occurs is not entirely clear. In this study we demonstrate that CD40 ligation on Ag-presenting B cells (APC) for a short period between 30 min and 3 h has a rapid, augmenting effect on the ability of a B cell line and normal B cells to activate T cells. This is not due to alterations in Ag processing or to an increase in surface expression of CD80, CD86, ICAM-1, or MHC-II. This effect is particularly evident with naive, resting T lymphocytes and appears to be more pronounced under limiting Ag concentrations. Shortly after CD40 ligation on a B cell line, MHC-II and CD80 progressively accumulated in cholesterol-enriched microdomains on the cell surface, which correlated with an initial enhancement in their Ag presentation ability. Moreover, CD40 ligation induced a second, late, more sustained enhancement of Ag presentation, which correlates with a significant increase in CD80 expression by APC. Thus, CD40 signaling enhances the efficiency with which APC activate T cells by at least two related, but distinct, mechanisms: an early stage characterized by aggregation of MHC-II and CD80 clusters, and a late stage in which a significant increase in CD80 expression is observed. These results raise the possibility that one important role of CD40 is to contribute to the formation of the immunological synapse on the APC side. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 6478–6487.

D4⁺ T cells recognize protein Ags as peptides bound to MHC class II molecules (MHC-II)³ (1, 2). Peptideloaded MHC-II (peptide-MHC-II) is the ligand for the TCR that, upon recognition by CD4⁺ T cells, marks the beginning of an adaptive immune response. Although recognition of peptide-MHC-II is essential, it is insufficient for Ag-specific CD4⁺ T cell activation, as a number of additional cell surface interactions are required (3). Among these are costimulatory signals, of which the interaction of CD80 or CD86 surface molecules on the APC with CD28 on the T cell is the best characterized (4, 5). Costimulation is a reciprocal process, as activated T cells also provide signals leading to APC maturation. The best-characterized cognate signal provided by T cells to the APC is the interaction of CD154 (CD40 ligand), a member of the TNF family, with its receptor CD40 on APC, a TNF receptor family molecule.

Signaling through CD40 induces a number of functions that differ depending on the type of APC (6, 7). CD40 ligation on dendritic cells (DC) induces the release of IL-12 and plays a role in their final maturation. On macrophages, CD40 ligation induces their activation and hence plays a role in the defense against intracellular pathogens (8, 9). The effects of CD40 signaling have been studied in detail in B cells, where CD40 ligation modulates the expression of many genes (10), leading to B cell proliferation and survival (11, 12), differentiation into Ab-secreting cells (13– 15), isotype switching (13, 16), and an enhancement of their ability to activate T cells during Ag presentation. The latter is due at least in part to up-regulation of CD80 expression (17–20). Others have proposed that CD40-induced enhancement of Ag presentation could be related to changes in the ability of B cells to process Ags (21). These findings are not mutually exclusive.

In many cell systems it has been demonstrated that receptor signaling is greatly enhanced by incorporation into cholesterolenriched cell membrane microdomains (22-24), also referred to as lipid rafts. During T cell Ag recognition, TCR signaling induces the aggregation of TCR and costimulatory receptor-containing rafts, eventually leading to the formation of the immunological synapse, which polarizes the reciprocal activation processes of the T cell and the APC (25-28). Lipid rafts containing MHC-II also exist on the APC surface before T cell Ag recognition (29). These appear to be essential to increase the number of TCR/CD3 complexes engaged during Ag presentation. Clustering of these lipid rafts on the APC side during early T cell Ag recognition could lead to a local increase in MHC-II and costimulatory molecule density. Therefore, the increased overall T cell-APC avidity would result in more efficient T cell activation. Besides an increase in the efficiency of Ag presentation, this could lead to enhanced signaling through MHC-II on the APC itself (30).

During DC maturation, MHC-II molecules are transported from intracellular processing compartments to the cell surface (31, 32). Moreover, engagement by specific TCR triggers the export of MHC-II molecules from intracellular compartments in a unidirectional manner to the immunological synapse on DC (31, 32). Although it is not known whether a similar phenomenon occurs during Ag presentation by B cells, candidate signals that may induce the recruitment of MHC-II to the cell surface and the immunological synapse are surface Ig, CD40, and the ligands for the different Toll-like receptors. Indeed, MHC-II and CD40 can be associated

^{*}Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; and [†]Department of Immunology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105-2794

Received for publication March 3, 2003. Accepted for publication October 1, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant 30899-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologial México (to J.M. and L.C.B.), and by Cancer Center Support Center of Research Excellence Grant CA21765 and the American Lebanese Syrian Associated Charities (to D.A.A.V.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. José Moreno, Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Apartado Postal A-047, 06703, Coahuila No. 5, Col. Roma, México. E-mail address: jmoreno49@prodigy.net.mx

³ Abbreviations used in this paper: MHC-II, class II MHC molecule; CTB, cholera toxin B; DC, dendritic cell; GM1, ganglioside M1; HEL, hen egg-white lysozyme.

on the cell surface, and reciprocal stimulation through either molecule increases their presence in detergent-insoluble fractions (33, 34).

In the present study we found that CD40 ligation on B cells had a dual positive effect on Ag presentation. An early effect was characterized by a rapid clustering of MHC-II and CD80 in cholesterol-enriched domains on the cell surface that correlates with an increased ability to stimulate both T cell hybridomas and naive T cells, which is followed by a more pronounced late effect, which correlates with increased expression of CD80.

Materials and Methods

Reagents and Ags

Hen egg-white lysozyme (HEL) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Culture medium was RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with 25 mM HEPES, 2 mM glutamine, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin, and 10% FBS (HyClone Laboratories, Logan, UT). Synthetic HEL or bovine RNase A peptides were either synthesized at the Hartwell Center, St. Jude Children's Research Hospital, or were purchased from Research Genetics (Huntsville, AL). Methyl- β cyclodextrin was from Sigma-Aldrich.

T cell hybridomas and other cell lines

HEL-specific, IA^k-restricted T cell hybridomas C10 (48-62) and A6.B3 (34-45) were gifts from Dr. L. Glimcher (Harvard University, Boston, MA) (35), E907.D (33-47) was generated by one of us (J.M.) and has been described previously (36). The bovine RNase A_{43-56} -specific T cell hybridoma TS12 was a gift from Dr. P. Allen (Washington University, St. Louis, MO) (37). The mouse B cell hybridoma LK-35.2 (H-2^{k,d}; American Type Culture Collection, Manassas, VA) (38) was used as APC. The IL-2-dependent cell line CTLL-2 (39) was obtained from American Type Culture Collection. All cells were maintained in culture in complete medium at 37°C in 5% CO₂.

Mice and T cell purification

Mice bearing the rearranged $\alpha\beta$ -chain genes from the anti-HEL₄₆₋₆₁ T cell hybridoma 3A9 in C3H (H2^k) background (3A9 mice) have been described previously (40). 3A9 CD4⁺ T cells were purified by B220, CD8, IA^k, NK1.1, CD14, and CD69 negative selection (BD PharMingen, San Diego, CA) FACS using a Mo-Flo flow cytometer (Cytomation, Fort Collins, CO).

Monoclonal Abs

The hybridoma H116.32 (secreting IgG2b anti-Ia α^{k}) (41) was a gift from Dr. G. Hämmerling (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). Hybridoma secreting the rat-derived anti-CD40 mAb 1C10 (42) was a gift from Dr. A. Heath (University of Sheffield, Sheffield, U.K.), the rat hybridomas secreting anti-CD11b mAb 70.15.11.5.HL (IgG2b), GL-1 (IgG2a anti-CD86), and the hybridoma 1G10 (IgG2a anti-CD80) were acquired from American Type Culture Collection. All mAbs were used either as culture supernatants or purified from ascites in Sepharose 4B-protein A or protein G columns (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). For the confocal microscopy experiments, purified 1G10 Ab was labeled with Texas Red (Pierce, Rockford, IL) as described in the product brochure. Anti-MHC-II (H116-32) was either biotinylated (Pierce) or labeled with Texas Red. Finally, anti-CD54-biotin (clone 3E2), and anti-CD80-FITC (clone 1G10) were purchased from BD PharMingen.

Ag presentation assays

For these studies a variable number of APC (LK-35.2) were cultured with 5×10^4 T cell hybridoma cells for 24 h in the absence or the presence of exogenous HEL or the relevant peptide in triplicate wells in 96-well plates in a final volume of 200 μ l. At 24 h, 100 μ l of supernatant was recovered and cultured for 36 additional h with 10⁴ CTLL-2 cells. During the last 16 h of culture 1 μ Ci [³H]TdR was added to each well. Cultures were harvested with a semiautomatic cell harvester (Tomtec, Hamden, CT), and DNA synthesis was determined in a scintillation counter (Wallac, Gaithersburg, MD).

Cytokine quantitation

IL-2 and IFN- γ concentrations were determined using a multiplexed, particle-based, flow cytometric assay as previously described (43).

Flow cytometry

This was conducted after reacting cells with the appropriate mAbs and fluorescent dye-labeled second reagents. All Ab reactions were conducted at 4°C in PBS containing 0.1% sodium azide and 1% rabbit serum to prevent binding of mAb to Fc receptors. Some Abs were biotinylated (as indicated in the figure legends), followed by fluorescent dye-labeled streptavidin (BD PharMingen or Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA)). One- to four-color flow cytometry was conducted in a dual laser FACSort flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

Confocal microscopy

LK35.2 cells (10⁴) were cultured at 37°C on sterile glass slides in a volume of 200 μ l for 24 h, after which 10 μ g/ml anti-CD40 or anti-CD11b (control) was added and incubated at 37°C for varying lengths of time. Slides were washed, fixed in 4% paraformaldehyde, stained for the expression of MHC-II (Texas Red or Alexa 488), ganglioside M1 (GM1; Alexa 488-cholera toxin B (Alexa 488-CTB)) and CD80-Texas Red. Cover glasses were mounted on Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), sealed with acrylic resin, and observed under a confocal microscope (model LSM510; Carl Zeiss, New York, NY) equipped with a dual laser. Fluorescence detection was conducted simultaneously with excitation/emission at 488/520 nm for FITC or Alexa 488, and at 596/633 nm for Texas Red. Images (×40 and ×100) were acquired with a 2024 × 2024 pixel resolution and stored in the computer, after which they were processed and analyzed by means of the LSM5 Image Examiner software (Carl Zeiss).

Results

CD40 ligation induces enhanced Ag presentation in a manner that is not related to Ag processing

The aim of our initial experiments was to confirm that CD40 ligation on APC contribute to their Ag-presenting functions and to examine whether this phenomenon occurred with more than a single epitope. Treatment of the B cell hybridoma LK-35.2 with agonist anti-CD40 mAb in the presence of varying concentrations of HEL enhanced the ability of the T cell hybridomas C10 (48-62), A6.B3 (34-45), and E.907D (33-47) to see Ag and to release IL-2. For A6.B3 and E.907D, this was more evident at low Ag dose (Fig. 1*A*). Similar results were obtained with a T cell hybridoma specific for another Ag, bovine RNase A (data not shown and Fig. 2). Thus, CD40 ligation induces an enhancement of Ag presentation of at least four different epitopes from two proteins.

The enhancing effect of CD40 stimulation on Ag presentation also occurs without the need for Ag processing, as CD40 ligation on LK-35.2 cells also enhances their capacity to induce IL-2 release by the same T cell hybridomas in response to their corresponding synthetic peptides (Fig. 1*B*). The enhancement occurred regardless of the time of peptide addition, as this occurred when the peptides were added to live LK-35.2 cells and T cell hybrids during the incubation with anti-CD40 (Fig. 1*B*, *extreme right*) or if the peptide were added to CD40-activated APC that were fixed with paraformaldehyde just before the addition of peptide (Fig. 1*B*, *left* and *center*). Therefore, to avoid possible confusion caused by the effect of anti-CD40 on intracellular Ag handling, all additional experiments were performed with APC stimulated with anti-CD40 for varying lengths of time and fixed with paraformaldehyde before the addition of synthetic peptides.

CD40 ligation-induced enhancement of the ability of APC to activate T cells during Ag presentation occurs in two sequential phases

We next examined the kinetics of anti-CD40-induced enhancement of Ag presentation and its relation to the expression of the costimulatory molecules CD80 and/or CD86. Increased CD80 expression was seen, but only after a 12-h incubation in the presence of anti-CD40 (Fig. 2A). The expression of CD86, ICAM-1, and MHC-II did not change after 72 h in the presence of anti-CD40.

It was important to define whether the enhancement of Ag presentation correlated with the kinetics of CD80 expression. We, therefore, conducted experiments with LK-35.2 cells treated with

FIGURE 1. A, CD40 ligation induces enhanced Ag presentation, which is not related to Ag processing. LK-35.2 cells (2.5×10^4) were cultured a with 5×10^4 T cell hybridomas in the presence of 10 μ g/ml of the mAbs 1C10 (anti-CD40) or 70.15.11.5.HL (anti-CD11b, control) and varying concentrations of HEL (A) or the indicated peptide (B), which was added either before (extreme right) or after (left and center) CD40 and cell fixation with paraformaldehyde. After a 24-h culture, 100 µl of supernatant was transferred to a new plate with 10⁴ CTLL-2 cells in a total volume of 200 µl. Twenty hours later 1 µCi [3H]TdR was added, and cells were cultured for an additional 18 h, then harvested in a semiautomated harvester (Tomtec). DNA synthesis ([³H]TdR incorporation) was measured in a scintillation counter. Results are expressed as counts per minute. Data shown are representative of at least five experiments conducted with these and other HEL-specific T cell hybridomas.



anti-CD40 for varying lengths of time and fixed with paraformaldehyde before the addition of synthetic peptides. CD40 ligation enhanced the ability of APC to stimulate IL-2 release by T cell hybridomas specific for HEL₃₄₋₄₅ or bovine RNase A₄₃₋₅₆ as early as 30 min after the addition of anti-CD40 (Fig. 2B, center and right). This enhancement had a first peak at 3 h, before any detectable increase in CD80 expression (Fig. 2B, left). At 12 h, there was a further enhancement of the ability of LK-35.2 cells to induce IL-2 release, which was coincident with a significant increase in CD80 expression. These results allow us to conclude that the increase in CD80 expression is not involved in the early enhancement of Ag presentation induced by CD40 ligation. Moreover, as the preprocessed Ag (synthetic peptide) was added to metabolically inactive APC previously activated through CD40, the enhancing effect is unrelated to Ag uptake and/or intracellular handling.

Short-term anti-CD40-activated B cells have an increased ability to activate naive $CD4^+$ T cells

The former Ag presentation experiments were conducted with T cell hybridomas, which have a lower threshold for activation. Moreover, if enhanced costimulation via CD80-CD28 is the major benefit of short-term CD40 ligation, T cell hybridomas are representative of secondary T cells, which are less dependent of CD80-CD28 interactions. As it has been shown that CD40 signaling enhances the ability of resting B cells to activate naive T cells (44), it was important to examine whether the early, costimulator-independent activation of LK-35.2 cells was sufficient to enhance their ability to activate naive T cells. Thus, we tested the capability of anti-CD40-treated LK-35.2 cells to activate resting naive T cells from 3A9 transgenic mice, which bear the rearranged α - and β -chain TCR genes from a HEL₄₈₋₆₂-specific T cell hybridoma (40). To ensure that other accessory cells and activated cells were not present during the assay, spleen CD4⁺ T cells from 3A9 mice were purified by FACS-negative selection after staining with a mixture of PE-labeled mAbs specific for MHC-II (IA^k), B220,

NK1.1, CD14, CD8, and CD69. The remaining cells were typically small lymphocytes and were >90% CD4⁺ with <1% cells positive for any of the mixture mAbs. For these experiments, LK-35.2 cells were incubated with 10 μ g/ml anti-CD40 for 3 h in the absence of Ag, washed, and fixed in 1% paraformaldehyde. The peptide HEL_{48–63} was added at increasing concentrations to the fixed APC and 3A9 cells, directly to the tissue culture wells.

Anti-CD40-treated LK-35.2 cells were significantly better at inducing naive $3A9 \text{ CD4}^+$ T cell proliferation after a 48-h incubation period compared with control LK-35.2 cells precultured for the same length of time in the presence of an irrelevant isotype control Ab (Fig. 3, *top panel*). When examined at later times, the differences in the T cell activation capacity of anti-CD40-treated and control LK-35.2 cells were less apparent, but still present (data not shown). These results clearly indicate that short-term CD40 stimulation prepares APC for Ag presentation to and activation of resting T cells.

To examine whether activation of naive CD4⁺ T cells by anti-CD40-activated APC induced the release of cytokines, supernatants obtained from the previous experiment were tested for the presence of IL-2, IL-4, and IFN- γ . CD40-activated APC induced IL-2 and IFN- γ (Fig. 3, *middle* and *bottom panels*), but no IL-4 (data not shown), release by freshly isolated 3A9 T cells. The results indicate that CD40 ligation primes APC to have an enhanced ability to activate T cells and to induce an early release of effector cytokines.

Short-term CD40 ligation on normal B cells is sufficient to enhance their Ag-presenting capacity

Among the mechanisms needed to turn resting B cells into professional APC are IL-4, which induces MHC-II expression, Ig cross-linking by Ag, and T cell-derived signals, particularly CD40 ligation (5, 45). These events act in concert to allow B cells to enter into an activated state in which they can activate Ag-specific T cells. Although the precise role of these events has not been established, the results shown to date suggest that CD40 could be



FIGURE 2. CD40 ligation induces a dual enhancement on the ability of APC to activate T cells during Ag presentation in B cell lymphomas. *A*, LK-35.2 cells were cultured for different lengths of time in six-well plates (2×10^5 cells/well in 2 ml) in the presence or the absence of 10 µg/ml anti-CD40 or anti-CD11b mAb (control). Alter the culture period, cells were reacted with the following mAb (with or without streptavidin-PE): anti-CD80-FITC, anti-ICAM-biotin, anti-CD86-Alexa 488, or anti-MHC-II-biotin. Results are expressed as stimulation index minus 1, which represents the number of times over baseline surface expression of each surface marker in unstimulated LK-35.2 cells. *B*, *Left*, cells were precultured with anti-CD40 or control Abs as in *A*, after which were stained with anti-CD80-FITC and examined in a flow cytometer. Results are expressed as the mean fluorescence intensity. The two *lower right panels* show the same LK-35.2 cells depicted in the *left panel*, used for the Ag presentation assay after fixation with 1% paraformaldehyde and used in Ag presentation assays (2.5×10^4 cells) with 5×10^4 T cell hybridomas A6.B3 (HEL₃₄₋₄₅) or TS12 (RNase A₄₃₋₅₆) in the presence of varying concentrations of the relevant synthetic peptides. The results shown depict the data obtained with optimal peptide concentrations (HEL₃₃₋₄₇ and bovine RNase A₄₃₋₅₆; 0.3 and 3 µM, respectively). After a 24-h culture, 100 µl of supernatant were transferred to a new plate with 10⁴ CTLL-2 cells and processed as in Fig. 1. Results are expressed as counts per minute $\times 10^{-3}$. The data are representative of three experiments with similar results. Fixed LK-35.2 cells failed to induce IL-2 release by T cell hybridomas in response to native HEL (10 µg/ml).

the major stimulus leading to the enhancement of the Ag-presenting function of B cells. Therefore, we examined the effect of anti-CD40 on the expression of CD80, CD86, MHC-II, and ICAM-1 by freshly isolated spleen B cells as well as on their ability to induce IL-2 release by T cell hybridomas. To ensure that the effect was not due to the possible presence of LPS in the medium, these experiments were conducted in the presence of polymyxin B. Anti-CD40 induced an increase in MHC-II, CD80, and ICAM-1 expression to near-optimal levels at 72 h (Fig. 4*A*). CD86 was induced at 3 h to decline at 12 h. This differs from LK-35.2 cells, which are constitutively positive for all these markers, except for CD80, which is weak in unstimulated LK-35.2 cells and was induced by CD40 ligation (Fig. 2*A*). CD40 ligation for a short period of 3 h was again sufficient to render normal B cells into fully competent APCs for T cell hybridomas (Fig. 4*B*).

CD40 ligation induces early redistribution and aggregation of MHC-II on the APC surface

It was recently shown that MHC-II on the APC surface concentrate in lipid rafts, even before any contact with T cells, and that raft disruption impairs Ag presentation (29). The stimulus (or stimuli) leading to MHC-II clustering in lipid rafts is as yet unknown. As CD40 is a major costimulator for APC, and it has been shown to associate with class II on the surface of B cells (33, 34), it was

possible that some of the enhancing effects of CD40 ligation on Ag presentation could be through the induction of MHC-II cluster formation. LK-35.2 cells cultured in the presence of anti-CD40 for different lengths of time, stained with Texas Red-labeled anti-MHC-II, and viewed under a confocal microscope (Fig. 5A). In unstimulated cells, MHC-II are evenly distributed in small clusters over the cell surface, and anti-CD40 induces a progressive aggregation into larger clusters, reaching a peak at 3 h. Before any stimulus, the percentage of large (>1.5 μ m) clusters was ~4.1 at 1 h; CD40-induced clusters occurred in 69 \pm 14% of cells rising to 83 \pm 2.5% at 3 h and 85 \pm 2% at 24 h (Fig. 5B). These clusters presented in two main patterns; nearly half the cells had a patchy distribution of large clusters, whereas the remaining cells showed a complete polarization of MHC-II molecules into a very large high density structure (Fig. 5 and data not shown). Cluster aggregation was not just a passive effect of anti-CD40 cross-linking, as it did not occur in LK-35.2 cells cultured with anti-CD40 in the presence of 0.1% NaN₃ (Fig. 6).

Anti-CD40-induced aggregation of surface MHC-II includes CD80

In dendritic cells, MHC-II colocalize with the costimulatory molecules CD80/86, even before they reach the cell surface (46). Therefore, we examined whether, in addition to MHC-II cluster



FIGURE 3. Short-term anti-CD40-activated B cells have an increased ability to activate naive CD4⁺ T cells. Naive resting CD4⁺ spleen T cells (5×10^4) from anti-HEL₄₈₋₆₂ transgenic mice (3A9) were cultured in the presence of 2.5 \times 10⁴ anti-CD40 or control-treated (3 h), paraformaldehyde-fixed LK-35.2 cells for 48 h in duplicate plates (triplicate wells), after which 1 μ Ci of [³H]TdR was added per well (*top*), or 100 μ l of supernatant was removed (middle and bottom). For T cell proliferation, plate 1 was cultured for an additional 18 h, after which it was harvested in a semiautomated cell harvester and counted in a scintillation counter. Results are expressed as counts per minute $\times 10^{-3}$. Supernatants from plate 2 were tested for the presence of the cytokines IL-2 (middle), IFN- γ (bottom), and IL-4 (not shown) by a flow cytometric assay after incubation with fluorescent beads coupled to anti-cytokine mAb, followed by a PE-labeled second anti-cytokine mAb and read in a FACSCalibur flow cytometer with Luminex equipment and software. Cytokines were plotted against a pattern curve and run in the presence of known concentrations of cytokine for each cytokine. Results are representative of two experiments.

aggregation, CD40 ligation could induce colocalization of MHC-II with the costimulatory molecule CD80 on the APC surface. For these experiments, LK-35.2 cells were cultured on sterile glass slides in the presence of anti-CD40 for varying lengths of time, after which cells were fixed and stained for the expression of MHC-II (Alexa 488) plus CD80 (Texas Red). LK-35.2 cells have a very faint basal expression of CD80, which is patchy and colocalizes with MHC-II in all cells that were positive for CD80, which were nearly 100% (Fig. 7). As shown by flow cytometry, incubation with anti-CD40 induces an increased expression of CD80 after 24 h, but not after 3 h. However, the distribution of CD80 follows that of MHC-II in the aggregated clusters induced by anti-CD40. These results indicate that MHC-II and CD80 are present in the same clusters before CD40 ligation, providing ligands for the TCR and the costimulatory receptor CD28, respectively. These clusters coaggregate into larger clusters to become a higher avidity target for T cells, which may result in more efficient T cell activation.

CD40 ligation-induced MHC-II clusters are in cholesterol and sphingolipid enriched domains on the APC surface

Lipid rafts appear to contain molecules that are the focal points for the initiation of signal transduction. Recent observations indicate that MHC-II molecules can be found in lipid rafts (29). Thus, we examined whether the MHC-II clusters and higher order aggregates induced by CD40 ligation were contained within sphingolipid (hence, cholesterol)-enriched microdomains as defined by CTB binding. For these studies, LK-35.2 cells were cultured on sterile glass slides in the presence or the absence of anti-CD40 for different lengths of time, after which they were stained for GM1 (Alexa 488-CTB) and MHC-II (Texas Red) and observed under a confocal microscope. Before CD40 ligation, LK-35.2 cells express MHC-II with a basal colocalization with GM1 in small patches along the cell surface (Fig. 8). Incubation with anti-CD40 at 37°C for as little as 1 h (data not shown) was sufficient to increase the patch size, which reached a maximum at 3 h and was always colocalizing with GM1. All MHC-II clusters on the cell surface were contained within GM1-positive spots. Moreover, MHC-II clusters on the cell surface were disrupted by methyl-\beta-cyclodextrin, which depletes cholesterol. Thus, CD40 ligation induces aggregation of small MHC-II-containing cholesterol/sphingolipid-enriched rafts into larger clusters. Moreover, although we did not carry out simultaneous staining for CD80 expression, the almost complete colocalization of MHC-II with either GM1 or CD80 also suggests CD80-MHC-II association in lipid rafts. In contrast, methyl-B-cyclodextrin failed to disrupt MHC-II clusters in LK-35.2 stimulated through CD40 for 24 h. This suggests that although the initial CD40-induced aggregation of MHC-II essentially takes place in lipid rafts, these organize later into more complex structures.

As it has been reported that in some human B cell lines CD40 and MHC-II are associated on the cell surface (33, 34), we examined whether such an association also occurs in LK-35.2 cells both before and after CD40 ligation. However, CD40 expression by LK-35.2 cells under the confocal microscopy was faint, not allowing us to ascertain its possible colocalization with MHC-II (data not shown).

MHC-II and CD80 accumulation in lipid rafts induced by CD40 ligation correlates with an early enhancement in Ag presentation

As CD40 ligation was followed by an aggregation of MHC-II and CD80 lipid rafts into larger clusters together with an early enhancement of Ag presentation, it was of interest to examine whether disruption of such lipid rafts would abrogate the enhancing effects of CD40 ligation on Ag presentation. LK-35.2 cells were treated as described above, in the presence or the absence of methyl- β -cyclodextrin. Fig. 9 shows that methyl- β -cyclodextrin, in addition to disrupting MHC-II clusters, reverses the early positive effects of CD40 ligation on Ag presentation. Thus, the presence of larger MHC-II/CD80 lipid rafts directly correlates with the early enhanced Ag presentation induced by short-term CD40 ligation. This was not the case for the enhancing effect of anti-CD40 on cells stimulated for 24 h, which was not reversed by methyl- β -cyclodextrin and correlated with an increase in CD80 on the APC surface and a relative resistance to raft disruption by methyl- β -cyclodextrin, suggesting, again, that these higher order clusters are held together by a different mechanism.

Discussion

Although it has been known for a while that CD40 ligation exerts a positive effect on B cells as APC, it is not entirely clear how it

FIGURE 4. CD40 ligation enhances the Ag-presenting ability of normal B cells. A, Resting spleen B cells from C3H/HeJ mice were purified by negative selection panning (CD3⁻/CD11b⁻) and were cultured in sixwell plates $(1.5 \times 10^6 \text{ cells/well in 2 ml})$ in the presence of 10 μ g/ml anti-CD40 or anti-CD11b mAb for the indicated lengths of time. At the end of the culture, cells were fixed with 1% paraformaldehyde, reacted with the indicated mAb, and examined in a flow cytometer. B, The same B cells (5×10^4) shown in A were cultured with the T cell hybridoma A6.B3 in the presence of varying concentrations of HEL33-47 peptide for 24 h, after which 100 μ l of supernatant was removed and tested for the presence of IL-2 by their ability to induce CTLL-2 cell proliferation. The results shown correspond to 0.3 μ M peptide and are representative of two experiments.



is achieved. One mechanism that has been conclusively demonstrated is enhanced costimulation via induction of CD80 expression on B cells (17–20). It has also been proposed that CD40 ligation improves Ag processing, through an as yet unknown mechanism (21). In the current studies we examined the nature of this phenomenon and found a positive effect of CD40 ligation on B cells as APC due to at least two mechanisms, both unrelated to Ag processing: 1) an early effect due to induced aggregation of MHC-II and CD80 lipid rafts into larger clusters, and 2) a late effect that correlates with an increase in costimulation via CD80. The early effect is sufficient to confer on B cells the ability to activate naive T cells, which in response secrete both IL-2 and IFN- γ .

Among the TNF receptor family members, CD40 has one of the widest spectra of functions in the immune system. Its capacity to enhance the ability of APC to activate T cells in response to Ag has been demonstrated for DC (6, 47, 48) and B cells (44). The Agpresenting function of B cells requires a change from a resting, tolerogenic, nonprofessional Ag-presenting B cell into an activated, professional APC fully capable of activating T cells. B cells, but not other APC from CD40-null mice, have a defect in Ag presentation (49). These studies together with our current findings place CD40 ligation as the major stimulus driving B cell Ag-presenting functions.

Previous findings that CD40 ligation induces an enhancement of the ability of B cells to activate T cells in response to an intact protein (pigeon cytochrome c) but not in response to the peptide have suggested that CD40 improves Ag processing (21). However, unlike other studies in which CD40 ligation augments processing in the class I MHC pathway via increased expression of peptide transporters (50), the mechanisms involved in the increased processing for MHC-II presentation are not clear. We found an enhancement of presentation to T cells specific for two different Ags, which differ in Ag processing requirements (51). Although anti-CD40 ligation could have an enhancing effect on Ag processing, the presentation of synthetic peptides was also enhanced by anti-CD40, indicating that additional mechanisms are involved.

In recent years increasing evidence indicates that many receptors signal while associated with lipid rafts. They provide a mechanism for increasing receptor density, which allow the association with intracellular signal transduction modules that include, among others, G proteins, phospholipases, and their substrates. It has been shown that MHC-II can accumulate in cholesterol-enriched domains (29), which may be necessary for signaling into the APC via activation of tyrosine kinases (52). Moreover, T cell recognition of MHC-II in lipid rafts on DC induces an enhanced response by CD8⁺ T cells (53). Thus, MHC-II accumulation in lipid rafts is important for these molecules to function as signaling receptors.

The former scenario has only recently been considered for MHC-II molecules as ligands. Indeed, Anderson et al. (29) found that MHC-II accumulation in lipid rafts is necessary for efficient Ag presentation to CD4⁺ T cells under limiting Ag conditions (29). However, it is not known whether MHC-II molecules need a stimulus to integrate into lipid rafts and whether lipid rafts in nonactivated and activated APC are different. We found that CD40 ligation induces small MHC-II and CD80 containing cholesterol/ sphingolipid-enriched rafts to aggregate into larger clusters. Moreover, although we did not do simultaneous staining for CD80 expression, the almost complete colocalization of MHC-II with either GM1 or CD80 suggests that the early association of CD80-MHC-II takes place in lipid rafts. Whether this is due to intracellular preassembly into secretory modules or occurs at the cell surface is not clear. At later times, MHC-II clusters were not disrupted by cholesterol depletion, which correlated with a relative resistance of APC to methyl-*B*-cyclodextrin in Ag presentation assays. This suggests that these early cholesterol-mediated aggregates further organize into higher order structures, which could be held together by the cytoskeleton. We have not yet tested this formally. In any case, the initial association of MHC-II with CD80 by itself in LK-35.2 cells is not dependent on CD40 ligation.



FIGURE 5. CD40 ligation induces an early redistribution and coaggregation of MHC-II on the APC surface. A, LK-35.2 cells (10⁴/slide) were cultured for varying lengths of time in culture slides in 200 µl of culture medium in the presence of 10 µg/ml anti-CD40 or anti-CD11b (control) mAb, after which cells were fixed with 4% paraformaldehyde and reacted with biotinylated anti-MHC-II Ab, followed by streptavidin-Texas Red. Slides were observed under a confocal microscope with an excitation filter of 540 nm and an emission filter at 590 nm. Cells are shown above as Nomarsky and red fluorescence. Below, we show the three-dimensional graphic representation of the fluorescence for the particular, representative cell shown above (height equals fluorescence intensity). Each cell shown is representative of >50 cells counted. These experiments were conducted at least four times with similar results. B, Percentage of cells with small (<1.5 μ m; 🖾) or large (>1.5 μ m; \Box) clusters (including polarized). Data are shown as the mean of 50-200 cells counted in independent experiments (two or three, except for *, where one field with >100 cells was counted). SDs are shown in squares for each set counted.

Costimulator induction has largely been considered the mechanism by which a resting B cell becomes a professional APC (44, 54–56). In addition to the classical CD80/CD86-CD28-mediated costimulation, other forms of costimulation have been described in CD40-activated B cells (55). We found that CD40-induced aggregation of MHC-II and CD80 on the B cell surface was sufficient to



FIGURE 6. MHC-II clustering induced by CD40 ligation is energy dependent. LK-35.2 cells (10^4 /slide) were cultured for 3 h in culture slides as described in Fig. 5 in the presence of 10 µg/ml anti-CD40 or anti-CD11b (control) with or without the addition of 0.1% sodium azide, after which cells were observed under a confocal microscope as described in Fig. 5. Experiments in *C* were performed twice with similar results.

enhance Ag presentation to naive CD4⁺ T cells. Although LK-35.2 cells have a baseline expression of MHC-II and costimulatory molecules, there was no need for an increase in the baseline levels of costimulation, at least through CD80-CD28, to enhance their ability to activate naive T cells, although more conclusive data await studies with CD86 as well. Thus, it appears that MHC-II plus the low level CD80 clustering in lipid rafts are sufficient for B cells to function as professional APC. Before CD40 ligation, all CD80 was already found in association with MHC-II clusters, with the remaining MHC-II appearing diffuse along the LK-35.2 cell surface.

The mechanism leading to cluster formation after CD40 ligation is not readily clear. Most studies of the functional effects of CD40 ligation have been conducted for longer than the 3-h incubation period used in this study. CD40 ligation is followed by the recruiting of adaptor proteins of the TNF receptor-associated factor family (57). Although the immediate events following TRAF recruitment have not been completely defined, CD40 ligation on B cells induces or inhibits the expression of >100 genes through three main signal transduction pathways that include members the mitogen-activated protein kinase p38 and phosphatidylinositol 3-kinase and translocation into the nucleus of members the NF-KB/Rel transcription factors (58). The early appearance of MHC-II/CD80 cluster aggregation after CD40 ligation makes it unlikely to be transcriptionally regulated. On the cell surface, CD40 resides in lipid rafts that also contain other molecules involved in CD40 signaling (59). It will be of relevance to examine whether MHC-II and CD80 reside in the same lipid rafts and if local changes in the organization of signaling modules in these rafts are related to the effects described herein. We are currently undertaking studies to define the signal transduction pathways involved in CD40 ligationinduced MHC-II/CD80 cluster aggregation on B cells.

Why does aggregation of MHC-II/CD80 clusters have such a dramatic impact on the ability of B cells to activate T cells? We suggest that large MHC-II/CD80 clusters provide a higher avidity target that engages greater numbers of TCRs from the start of T cell-APC interaction. This eventually leads to formation of the immunological synapse (60) and indeed provides a better means for reciprocal signaling between T cells and APC, leading to full activation of both cells. It has been recently shown that MHC-II-peptide-containing lipid rafts accumulate at the immunological



FIGURE 7. CD40 ligation induces coaggregation of MHC-II and CD80 on the APC surface LK-35.2 cells were cultured for varying lengths of time in culture slides as described in Fig. 3. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and reacted with biotinylated anti-MHC-II Ab, followed by streptavidin-Alexa 488 and anti-CD80-Texas Red. Slides were observed under a confocal microscope with long pass excitation filters from 488–540 nm and emission filters at 530 and 590. Results represent three experiments with comparable results.

synapse (61). Our results place CD40 ligation as an important inducer for such accumulation and indicate that in addition to MHC-II, the costimulatory molecule CD80 is included in such raft accumulation. This provides $CD4^+$ T cells with the complete set of signals for proper activation.

Although CD40 ligation is not the initial stimulus for the APC, it is an early event, as CD154 expression by T cells occurs within a few hours after their initial activation by Ag. If our observations are relevant in vivo, we could consider at least two possible scenarios. We favor the view that CD40 ligation could play its main role in Ag presentation shortly after the initial stimulus via TCR, which is responsible for CD154 induction, by enhancing transport of MHC-II to the TCR-APC interphase, leading to synapse formation. This is not opposed to the observation that MHC ligation by the TCR down-modulates peptide-MHC complexes from the cell surface (62), because the increased clustering would occur mainly at the T cell-APC interphase. Thus, cluster induction by CD40 ligation is not needed for the initial interaction. However, for T cell Ag recognition, foreign peptides need to compete against a myriad of self peptides contained within the cell, first to bind to MHC-II and subsequently to be engaged by the appropriate number of TCRs to initiate T cell activation. CD40 ligation would increase the overall flow and nonspecific grouping of MHC-II molecules on the cell surface. The relevant MHC-II-peptide complexes



FIGURE 8. Short-term CD40 ligation-induced MHC-II clusters are contained in cholesterol- and sphyngolipid-enriched domains on the APC. LK-35.2 cells were cultured for varying lengths of time in culture slides as described in Fig. 5, except that in the indicated wells, methyl- β -cyclodextrin (10 mM) was added for the last 10 min of culture. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and reacted with biotinylated anti-MHC-II Ab, followed by streptavidin-Texas Red and cholera toxin B-streptavidin-Alexa 488. Slides were observed under a confocal microscope with long pass excitation filters from 488–540 nm and emission filters at 530 and 590. Data are representative of two experiments.



FIGURE 9. MHC-II clustering in lipid rafts correlates with early enhancement of Ag presentation. LK-35.2 cells were treated as described in Fig. 8 and were cultured (2×10^5 /well) in the presence of 10 µg/ml of the indicated mAb, after which 10 mM methyl- β -cyclodextrin was added to the indicated wells for the last 10 min of culture. Cells were fixed in 0.5% paraformaldehyde, washed, and cultured (2.5×10^4 /well) with the T cell hybridoma E907.D or TS12 (5×10^4 cells/well) in the presence of 0.3 µM peptides HEL₃₃₋₄₇ and RNase A₄₃₋₅₆, respectively for 24 h, after which 100 µl of supernatant was transferred to a new plate with 10^4 CTLL-2 cells and processed as described in Fig. 1. Results are expressed as counts per minute $\times 10^{-3}$ and are representative of three experiments. Mean values of control wells: fixed LK-35.2 and E907.D cells plus HEL (10 µg/ml): control, 1079 cpm; anti-CD40, 987 cpm; M β C-treated LK-35.2 and E907.D cells plus HEL (10 µg/ml): control, 589 cpm; anti-CD40, 1067 cpm, which do not differ from the counts obtained in the absence of Ag.

would then be selected among them by the TCR to form the immunological synapse, as it has recently been shown (61). Preliminary findings with LK-35.2 cells that neither TLR-9 activation nor B cell Ag receptor cross-linking provides a stimulus comparable to that of CD40 ligation, suggest that even though CD40 is not the initial stimulus to increase B cell Ag presentation, it still is an early event, and its relevance is supported by the inability of $CD40^{-/-}$ B cells to become professional APC (49).

An alternative explanation could be that the CD40 ligand could be expressed by a bystander cell. This seems unlikely, however, because although CD154 has been reported to be expressed by many cell types (63, 64), the only ones that have been convincingly and reproducibly shown to express CD154 are activated T cells and platelets (65, 66). Platelets are unlikely to be present in the lymphoid interstitium in sufficient numbers to ligate CD40 and activate B cells. Moreover, it is not desirable to trigger the professional Ag-presenting activity of B cells in the absence of the immunizing Ag.

In conclusion, the present studies provide evidence that CD40 ligation enhances the Ag-presenting function of B cells, which is related to an association of TCR and costimulatory receptor ligands on the APC surface. Thus, according to our working model, 1) the initial APC for CD4⁺ T cells, DC, induce CD154 expression on T cells, mainly via TCR signaling; 2) CD154 on activated CD4⁺ T cells interacts with CD40 on the resting B cell, which turns into a professional APC in two steps: an initial increase in local MHC costimulator density (rafts), providing a higher avidity ligand, followed by increased expression of CD80 that results in more efficient costimulation, eventually conducing to the formation of the immunological synapse at the T cell-B cell interphase; and 3) reciprocally, MHC-II rafts should allow better signal transduction of TCR-delivered signals into Ag-presenting B cells.

Acknowledgments

We thank all the scientists who kindly made available to us cell lines and reagents: Drs. Günter Hämmerling, Laurie Glimcher, Paul Allen, and Andy Heath. The comments of Drs. Elizabeth Langley, Fernando Esquivel, and Carlos Rosales and the assistance of Paty Rojo, Kate Vignali, and Augusto Aguilar are especially appreciated. We thank Dr. Leobardo Mendoza for assistance with the confocal microscope. Some of the experiments were conducted by J. Moreno as a visiting scientist to St. Jude Children's Research Hospital (DV laboratory). We also thank Creg Workman for advice, Janet Gatewood for the cytokine analysis, and Richard Cross for cell sorting.

References

- Allen, P. M., G. R. Matsueda, R. J. Evans, J. B. Dunbar, G. R. Marshall, and E. R. Unanue. 1987. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature 327:713*.
- Hedrick, S. M., L. A. Matis, T. T. Hecht, L. E. Samelson, D. L. Longo, E. Heber-Katz, and R. H. Schwartz. 1982. The fine specificity of antigen and Ia determinant recognition by T cell hybridoma clones specific for pigeon cytochrome c. Cell 30:141.
- Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, M. de Boer, and J. L. Ceuppens. 1996. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol. Rev.* 153:47.
- Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065.
- Yang, Y., and J. M. Wilson. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. 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. 184:747.
- Evans, D. E., M. W. Munks, J. M. Purkerson, and D. C. Parker. 2000. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/ CD40. J. Immunol. 164:688.
- Kato, T., R. Hakamada, H. Yamane, and H. Nariuchi. 1996. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. J. Immunol. 156:3932.
- Stout, R. D., J. Suttles, J. Xu, I. S. Grewal, and R. A. Flavell. 1996. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol.* 156:8.
- Dadgostar, H., B. Zarnegar, A. Hoffmann, X. F. Qin, U. Truong, G. Rao, D. Baltimore, and G. Cheng. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1497.
- 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.
- Newton, J. S., J. Li, Z. Q. Ning, J. D. Norton, and J. J. Murphy. 1996. Early response genes activated by stimulation of human B lymphocytes through different cell surface receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 24:75.
- Grewal, I. S., and R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol. Rev.* 153:85.
- Urashima, M., D. Chauhan, M. Hatziyanni, A. Ogata, D. Hollenbaugh, A. Aruffo, and K. C. Anderson. 1996. CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation. *Leuk. Res.* 20:507.
- Foy, T. M., D. M. Shepherd, F. H. Durie, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and R. J. Noelle. 1993. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymusdependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. J. Exp. Med. 178:1567.
- Lederman, S., M. J. Yellin, A. M. Cleary, A. Pernis, G. Inghirami, L. E. Cohn, L. R. Covey, J. J. Lee, P. Rothman, and L. Chess. 1994. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. J. Immunol. 152:2163.
- Grewal, I. S., H. G. Foellmer, K. D. Grewal, J. Xu, F. Hardardottir, J. L. Baron, C. A. Janeway, Jr., and R. A. Flavell. 1996. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 273:1864.
- Kennedy, M. K., K. M. Mohler, K. D. Shanebeck, P. R. Baum, K. S. Picha, C. A. Otten-Evans, C. A. Janeway, Jr., and K. H. Grabstein. 1994. Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.* 24:116.
- Somoza, C., and L. L. Lanier. 1995. T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions. *Res. Immunol.* 146:171.
- Ranheim, E. A., and T. J. Kipps. 1993. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. J. Exp. Med. 177:925.
- Faassen, A. E., D. P. Dalke, M. T. Berton, W. D. Warren, and S. K. Pierce. 1995. CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing. *Eur. J. Immunol.* 25:3249.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 1:31.

- 23. Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569.
- Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Threedimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82.
- Wulfing, C., and M. M. Davis. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282:2266.
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680.
- Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat. Immunol.* 2:487.
- Anderson, H. A., E. M. Hiltbold, and P. A. Roche. 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* 1:156.
- Lang, P., J. C. Stolpa, B. A. Freiberg, F. Crawford, A. Kupfer, and J. C. Cambier. 2002. TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-α/β dimers. *Science 291:1537*.
- Boes, M., J. Cerny, R. Massol, M. Op den Brouw, T. Kirchhausen, J. Chen, and H. L. Ploegh. 2002. T-cell engagement on dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418:983.
- Chow, A., D. Toomre, W. Garret, and I. Mellman. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 418:988.
- Leveille, C., F. Chandad, R. Al Daccak, and W. Mourad. 1999. CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells. *Eur. J. Immunol.* 29:3516.
- Leveille, C., R. Al Daccak, and W. Mourad. 1999. CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 29:65.
- Allen, P. M., D. J. McKean, B. N. Beck, J. Sheffield, and L. H. Glimcher. 1985. Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. J. Exp. Med. 162:1264.
- 36. Moreno, J., L. Adorini, and G. J. Hammerling. 1990. Co-dominant restriction by a mixed-haplotype I-A molecule ($\alpha_k \beta_b$) for the lysozyme peptide 52–61 in H-2k × H-2b F₁ mice. *J. Immunol.* 144:3296.
- Lorenz, R. G., A. N. Tyler, and P. M. Allen. 1988. T cell recognition of bovine ribonuclease: self/non self discrimination at the level of binding to the I-Ak molecule. J. Immunol. 141:4124.
- Kappler, J., J. White, D. Wegmann, E. Mustain, and P. Marrack. 1982. Antigen presentation by Ia⁺ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3604.
- Gillis, S. M., M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. 1978. T cell growth factor: parameters of induction and a quantitative assay. J. Immunol. 120:2027.
- Ho, W. Y., M. P. Cooke, C. C. Goodnow, and M. M. Davis. 1994. Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells. J. Exp. Med. 179:1539.
- Hämmerling, G. J., N. Koch, and A. Abe. 1982. Monoclonal antibodies to murine Ia antigens: studies in structure, function, epitopes, and idiotypes. In *Ia Antigens*. S. Ferrone, ed. CRC Press, Boca Raton, p. 55.
- Heath, A. W., W. Wu, and M. C. Howard. 1994. Monoclonal antibodies to murine CD40 define two distinct functional epitopes. *Eur. J. Immunol.* 24:1828.
- 43. Carson, R. T., and D. A. A. Vignali. 1999. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometry assay. *J. Immunol. Methods* 227:41.
- Evans, D. E., M. W. Munks, J. M. Purkerson, and D. C. Parker. 2000. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/ CD40. J. Immunol. 164:688.
- 45. Newton, J. S., J. Li, Z. Q. Ning, D. E. Schoendorf, J. D. Norton, and J. J. Murphy. 1996. B cell early response gene expression coupled to B cell receptor, CD40 and interleukin-4 receptor co-stimulation: evidence for a role of the egr-2/krox 20 transcription factor in B cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 26:811.
- Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787.

- Flores-Romo, L., P. Bjorck, V. Duvert, C. van Kooten, S. Saeland, and J. Banchereau. 1997. CD40 ligation on human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. J. Exp. Med. 185:341.
- McLellan, A. D., R. V. Sorg, L. A. Williams, and D. N. Hart. 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 26:1204.
- Ozaki, M. E., B. A. Coren, T. N. Huynh, D. J. Redondo, H. Kikutani, and S. R. Webb. 1999. CD4⁺ T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs. *J. Immunol.* 163:5250.
- Khanna, R., L. Cooper, N. Kienzle, D. J. Moss, S. R. Burrows, and K. K. Khanna. 1997. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol.* 159:5782.
- Nadimi, F., Moreno. J., F. Momburg, A. Heuser, S. Fuchs, L. Adorini, and G. J. Hämmerling. 1991. Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class IIassociated invariant chain. *Eur. J. Immunol.* 21:1255.
- Huby, R. D., R. J. Dearman, and I. Kimber. 1999. Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. J. Biol. Chem. 274:22591.
- Machy, P., K. Serre, M. Baillet, and L. Leserman. 2002. Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4⁺ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains. *J. Immunol.* 168:1172.
- Goldstein, M. D., M. A. DeBenedette, D. Hollenbaugh, and T. H. Watts. 1996. Induction of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in murine B cells: the CBA/N mouse reveals a role for Bruton's tyrosine kinase in CD40-mediated B7 induction. *Mol. Immunol.* 33:541.
- Wu, Y., J. Xu, S. Shinde, I. Grewal, T. Henderson, R. A. Flavell, and Y. Liu. 1995. Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40 ligand. *Curr. Biol.* 5:1303.
- Constant, S. L. 1999. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4⁺ T cell priming in vivo. J. Immunol. 162:5695.
- Hostager, B. S., and G. A. Bishop. 1999. Cutting edge: contrasting roles of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* 162:6307.
- Dadgostar, H., B. Zarnegar, A. Hoffmann, X. F. Qin, U. Truong, G. Rao, D. Baltimore, and G. Cheng. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1497.
- Pham, L. V., A. T. Tamayo, L. C. Yoshimura, P. Lo, N. Terry, P. S. Reid, and R. J. Ford. 2002. A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-κB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity* 16:37.
- Hee, L. K., Holdorf, A. D., M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295:1539.
- Hitbold, E. M., N. J. Poloso, and P. A. Roche. 2003. MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. J. Immunol. 170:1329.
- Kedl, R. M., B. C. Schaefer, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2002. T cells downmodulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nat. Immunol.* 3:27.
- Gauchat, J. F., S. Henchoz, D. Fattah, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Jomotte, L. Dash, K. Page, R. Solari, and D. Aldebert. 1995. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 25:863.
- 64. Gauchat, J. F., S. Henchoz, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Brunner, H. Blasey, P. Life, D. Talabot, L. Flores-Romo, and J. Thompson. 1993. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365:340.
- Garlichs, C. D., S. Eskafi, D. Raaz, A. Schmidt, J. Ludwig, M. Herrmann, L. Klinghammer, W. G. Daniel, and A. Schmeisser. 2001. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 86:649.
- Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus, and R. A. Kroczek. 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591.