

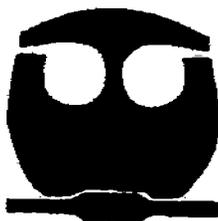


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS  
EFECTOS INDIVIDUALES Ó COMBINADOS  
DE LA LIGACIÓN DEL BCR, CD40 Y TLR9  
SOBRE LA PRESENTACIÓN DE  
ANTÍGENOS POR LINFOCITOS B.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
JOSÉ AUGUSTO AGUILAR RODRÍGUEZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA  
CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO 2006



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: AGUIAR RODRIGUEZ J. AUGUSTO

FECHA: 29/09/06

FIRMA: [Signature]

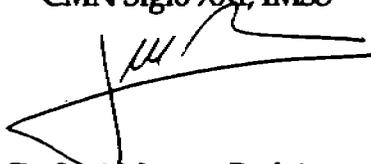
---

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B. Saturnino de León Chapa
Vocal	Dra. María Elena Ibarra Rubio
Secretario	Dr. José Moreno Rodríguez
Primer Suplente	Dr. José Ignacio Páramo Ramírez
Segundo Suplente	Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

Sitio donde se desarrolló el tema

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes  
Hospital de Especialidades  
CMN Siglo XXI, IMSS



Dr. José Moreno Rodríguez

Asesor

José Augusto Aguilar Rodríguez

Sustentante

*A mis padres, Josefina y Raymundo...*

... por toda su dedicación para hacer de mi un hombre de bien.

*A Noel...*

... por tu valentía al enfrentar las dificultades en la vida.

*A Selene ...*

... la luz que guía mis pasos aún en la mas profunda oscuridad

---

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el maravilloso regalo de la vida, permitirme disfrutar del camino y llegar a este punto del viaje...

A mis padres, porque este trabajo es el fruto de su esfuerzo y sacrificio a lo largo de toda una vida.

A Noel, mi hermano y amigo con quien he compartido los momentos mas felices de mi vida. Por que con su ejemplo me ha enseñado a no claudicar aún en las circunstancias mas difíciles

A Selene, por compartir conmigo sus sueños e inquietudes y por enseñarme que el único limite en la vida es el que uno mismo se impone.

Agradezco sinceramente a la familia Reynoso Rodríguez(Beto, Mary, Berna, Wendo, Sele y Arabid) por todo su apoyo en mi vida como estudiante.

A la Sra. Felisa González y el Sr. Jesús Néquiz, por sus sabios consejos y recomendaciones los cuales han sido fundamentales a lo largo de mi existencia.

Al Dr. José Moreno, por todo su apoyo y comprensión durante mi estancia en su laboratorio. A la Dra. Abigail Clatza Juárez por toda su ayuda, sus consejos y sus conocimientos los cuales han sido inestimables para poder llevar a buen término este trabajo.

---

A mis amigos en la UIMEAI, Paty, Judith, Erika, Atenea, Evita, Gibran y Rodrigo por los buenos momentos que pasamos durante mas de dos años y por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

A mis amigos y compañeros de la FQ, Selenita, Conce, Diana, Josefina, Sandra, Rafael, Miguel Ángel y Cesar; porque sin ellos mi paso por la universidad no hubiera resultado una experiencia tan grata

A la Universidad Nacional Autónoma de México que junto al Instituto Mexicano del Seguro Social me abrieron sus puertas para formarme profesionalmente.

**No hace falta que comprendas el desierto:  
basta con contemplar un simple grano de arena  
para ver en él todas las maravillas de la Creación**

**El Alquimista, Paulo Coelho**

---

# Índice general

---

<b>Jurado Asignado</b>	<b>I</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>II</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Contenido</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>X</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>5</b>
2.1. Mecanismos de regulación de la presentación antigénica	7
2.2. El receptor de antígeno del linfocito B. . . . .	9
2.2.1. Estructura, expresión y vías de señalización. . . . .	9

2.2.2.	Efectos de la activación del linfocito B a través del BCR en la presentación antigénica . . . . .	12
2.3.	El receptor CD40 y su ligando CD154 . . . . .	12
2.3.1.	Estructura, expresión y vías de señalización . . . . .	13
2.3.2.	Efectos de la interacción CD154-CD40 en la presentación antigénica. . . . .	15
2.4.	Receptores tipo Toll . . . . .	16
2.4.1.	Estructura y mecanismos de señalización de los TLR . . . . .	18
2.4.2.	Reconocimiento de CpG-DNA por TLR9 . . . . .	20
2.4.3.	Efectos de la interacción de TLR9 con su ligando . . . . .	22
<b>3.</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b> . . . . .	<b>24</b>
3.1.	Justificación . . . . .	24
3.2.	Planteamiento del problema . . . . .	25
3.3.	Hipótesis . . . . .	25
3.4.	Objetivos . . . . .	26
3.5.	Objetivos Particulares . . . . .	26
<b>4.</b>	<b>Material y Métodos</b> . . . . .	<b>27</b>
4.1.	Reactivos . . . . .	27
4.1.1.	Líneas celulares . . . . .	27
4.1.2.	Anticuerpos . . . . .	28
4.1.3.	Oligodesoxirribonucleótidos . . . . .	29
4.2.	Metodologías . . . . .	29
4.2.1.	Cultivos celulares y activación de Linfocitos B . . . . .	29
4.2.2.	Determinación de antígenos de superficie por inmunofluorescencia . . . . .	30
4.2.3.	Estudios de Endocitosis de Antígeno . . . . .	32
4.2.4.	Estudios de presentación de antígeno . . . . .	33
4.2.5.	Estudio de incorporación de <sup>3</sup> H-TdR . . . . .	34

<b>5. Resultados y Análisis</b>	<b>36</b>
5.1. La estimulación a través de CD40, BCR ó TLR9 en forma independiente aumenta la expresión de CD80, sin afectar la expresión de CD86, MHCII, ICAM-1 en la superficie de células LK- 35.2 . . . . .	36
5.2. La estimulación a través de CD40, BCR ó TLR9 simultáneamente la expresión de CD80, sin afectar la expresión de CD86, MHCII, ICAM-1 en la superficie de células LK-35.2 . . . . .	43
5.3. La estimulación a través de BCR pero no de CD40 y TLR9 promueve la capacidad endocítica de las células LK35.2.	48
5.4. La estimulación a través de CD40, pero no a través de otros receptores aumenta la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA para activar linfocitos T. . . . .	50
<b>6. Conclusiones</b>	<b>56</b>
<b>Referencias</b>	<b>57</b>

---

## Índice de tablas

---

2.1. Receptores tipo Toll y ligandos . . . . .	17
2.2. Principales diferencias entre el DNA de organismos vertebrados e invertebrados . . . . .	20
4.1. Condiciones de activación de los linfocitos B . . . . .	30
4.2. Determinación de antígenos en la superficie de linfocitos B activados . . . . .	32

---

## Índice de figuras

---

2.1. Prototipo estructural del receptor de antígeno de los linfocitos B . . . . .	10
2.2. Prototipo estructural de CD40 . . . . .	13
2.3. Prototipo estructural de la familia de Receptores tipo Toll . . . . .	19
5.1. Expresión de CD80, CD86 y CD40 en linfocitos activados con estímulos independientes . . . . .	40
5.2. Expresión de MHCII, ICAM-1 y CD45 en linfocitos bajo estímulos independientes . . . . .	41
5.3. Expresión de CD80, CD86 y CD40 en linfocitos bajo estímulos combinados . . . . .	46
5.4. Expresión de MHCII, ICAM-1 y CD45 en linfocitos bajo estímulos combinados . . . . .	47
5.5. Endocitosis de HEL-FITC por células LK35.2 bajo diferentes estímulos . . . . .	51
5.6. Presentación antigénica del péptido de 34-45 de HEL . . . . .	54
5.7. Estudio de presentación del péptido 42-56 de RNAsa bovina . . . . .	55

---

## Abreviaturas

---

BCR	Receptor de antígenos del linfocito B
CLIP	Péptido de cadena invariante asociado a MHCII
CPA	Célula presentadora de antígenos profesional
CPM	Cuentas por minuto
EST	Secuencias etiquetadas de expresión
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEL	Lisozima de huevo de gallina
IFN	Interferón
Ii	Cadena Invariante
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IMFr	Intensidad media de fluorescencia relativa
IRAK	Proteína cinasa asociada al IL-1R

IRF	Factor regulador de IFN
ITAM	Motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosinas
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIIIC	Compartimento enriquecido en MHCII
ODN	Oligodesoxinucleotidos
PAMP	Patrón molecular asociado a microorganismos patógenos
PBS	Solución tampón de fosfatos
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTK	Proteínas tirosina cinasa
RE	Retículo endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor de antígenos del linfocito T
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFr	Receptor de TNF
TRAF	Factor asociado al receptor del TNF

---

## RESUMEN

Uno de los eventos de mayor trascendencia para la respuesta inmune es la presentación antigénica a los linfocitos T, la cual es puntualmente regulada a través de varios mecanismos que modulan el comportamiento de la CPA, modificando substancialmente el curso de la respuesta inmune.

Uno de los mecanismos de regulación más importantes depende de moléculas coestimuladoras en la superficie de la CPA y el linfocito T. La interacción mejor caracterizada de los linfocitos T hacia la CPA, es la del par CD154-CD40, que aumenta la expresión de MHCII en la superficie de las CPA y promueve aumento en la expresión de algunas moléculas accesorias esenciales para la activación celular como CD86 y CD80 y moléculas de adhesión como ICAM-1 y CD23.

Por otro lado, la señalización a través del receptor de antígeno (BCR) tiene efectos notables sobre la activación de los linfocitos B, promoviendo su tasa de internalización, además de favorecer el procesamiento antigénico.

Otras moléculas capaces de regular la respuesta de la CPA sin intervención directa del linfocito T son los receptores tipo Toll, de los cuales TLR9 se asocia a una mayor secreción de algunas citocinas, además de aumentar la expresión de MHCII en superficie.

En el presente trabajo, se caracterizaron y compararon los efectos de los estímulos generados a través de BCR, CD40 y TLR9 sobre la capacidad de activación de los linfocitos B.

---

El modelo utilizado fue la línea celular LK-35.2 como CPA presentando antígeno a los hibridomas T A6B3 (anti-lisozima de gallina [HEL] 34-45) y TS12 (anti-RNAsa A bovina 42-56). Para evaluar el efecto de cada estímulo se examinaron tres parámetros: expresión de moléculas relacionadas con la activación celular (CD80, CD86, ICAM-1, MHCII y CD40) en la superficie de la CPA, la capacidad de endocitosis de antígeno (HEL) y la capacidad de presentación antigénica.

Los resultados obtenidos muestran que en el sistema utilizado, la señalización a través de CD40 es el estímulo más eficiente en el proceso de activación de los linfocitos B. Uno de sus principales mecanismos se lleva a cabo a través del aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

La señalización mediada por el BCR es importante en la activación de linfocitos B, promoviendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, además de aumentar la capacidad endocítica de la CPA.

El efecto de la señalización a través de TLR9 sobre la activación de linfocitos B se lleva a cabo a través del aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86

# CAPÍTULO UNO

---

## Introducción

---

El sistema inmune está formado por un sistema complejo de proteínas, células, órganos y tejidos que interactúan con el objetivo primordial de contener y eliminar a los agentes infecciosos en el organismo. La respuesta inmune en organismos superiores depende de dos sistemas de reconocimiento antigénico, el *sistema inmune innato* y el *sistema inmune adaptativo*, que aunque tienen funciones distintas, comparten características que los hacen estar íntimamente relacionados<sup>1</sup>.

El sistema inmune innato se caracteriza por receptores denominados *receptores de reconocimiento de patrones* (PRR, Patterns recognition receptors)<sup>2</sup>, los cuales son codificados en línea germinal, por lo que su especificidad está genéticamente predeterminada para cada especie. Estos receptores han evolucionado y han sido seleccionados con base en especificidades para *patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos* (PAMP, Pathogen associated molecular patterns). En este tipo de inmunidad, cada organismo tiene un número limitado de genes dedica-

dos al sistema inmune, con un número relativamente bajo de receptores capaces de reconocer PAMPs.

La respuesta inmune adaptativa está conformada por mecanismos evolutivamente más recientes que la inmunidad innata<sup>3</sup> y, a diferencia de ésta, sus receptores son altamente específicos, como es el caso de los *receptores de antígeno del linfocito B* (BCR, B cell receptor) y *del linfocito T* (TCR, T cell receptor), que en conjunto son capaces de reconocer prácticamente cualquier antígeno debido a procesos de recombinación aleatorios que ocurren durante su ontogenia y que generan una diversidad clonal, tan amplia que hay millones de receptores con especificidades diferentes.

Las interacciones intercelulares son de gran importancia en la respuesta inmune regulando la respuesta a infecciones y manteniendo la tolerancia inmunológica. Un ejemplo es la activación de los mecanismos adaptativos de la respuesta inmune, la cual ocurre como resultado de la interacción entre los TCR con péptidos unidos a las moléculas del *Complejo principal de histocompatibilidad* (MHC, Major histocompatibility complex) en la superficie de las *células presentadoras de antígeno* (CPA) durante la *sinapsis inmunológica* en un proceso conocido como *presentación antigénica*.

La activación de los linfocitos T depende en gran medida del tipo de CPA involucrada en la presentación antigénica. Existen tres diferentes tipos de CPA las cuales reconocen y presentan diferentes tipos de antígeno. Por una parte, las *células dendríticas*, los mejores activadores de las células T naïve, captan antígenos por pinocitosis y macropinocitosis, los *macrófagos* internalizan con gran eficiencia antígenos particulados y los *linfocitos B*, que presentan principalmente antígenos solubles unidos a sus MHCII.

La activación óptima de los linfocitos T depende no solo de la interacción entre el TCR y el MHC-péptido, sino de una señal adicional a través de moléculas accesorias conocida como coestimulación. La coestimula-

ción es un mecanismo de regulación de la activación de los linfocitos y se lleva a cabo a través de la interacción de moléculas de superficie tanto de la CPA como del linfocito T. Entre las interacciones coestimuladoras en linfocitos B, sobresalen la interacción entre CD28 y las proteínas de la familia B7, CD80 y CD86, además de la interacción entre CD154 y CD40.

La importancia de la interacción entre CD28 y sus ligandos se observa en ratones deficientes de CD28 ó de CD80/CD86, los cuales son incapaces de generar centros germinales *in vivo*, cambio de isotipo, formación de memoria inmunológica y maduración de la afinidad a través de hipermutación somática. Sin embargo, no ha sido establecido si estos defectos reflejan la necesidad de la señalización de CD28 en los linfocitos T y/o la señalización de CD80/86 en los linfocitos B<sup>4</sup>. La capacidad de CD28 de mediar la señalización en los linfocitos T ha sido demostrada en diferentes sistemas experimentales, pero también existe evidencia de la señalización a través de CD80/CD86 en linfocitos B. La función de la señalización de CD80/CD86 en la activación de los linfocitos B es probable aunque no ha sido directamente demostrada.

La interacción CD40-CD154 también es esencial para una respuesta humoral *in vivo*. En ratones deficientes de cualquiera de estas moléculas, se manifiestan patrones similares a los de los ratones deficientes en CD80/CD86 ó CD28. Sin embargo, los linfocitos B deficientes en CD40 producen anticuerpos en respuesta a ciertos antígenos T independientes. CD154 señala también en los linfocitos T, haciendo difícil determinar si la señalización a través de CD40 y/o CD154 es necesaria para la respuesta T dependiente de los linfocitos B.

Otros mecanismos diferentes de la coestimulación influyen en la activación de las células inmunes. La señalización a través del receptor de antígeno (BCR) tiene efectos notables sobre la activación de los linfocitos B, promoviendo su tasa de internalización, además de favorecer el procesamiento antigénico.

Otras moléculas capaces de regular la respuesta de la CPA sin intervención directa del linfocito T son los receptores tipo Toll, de los cuales TLR9 se asocia a una mayor secreción de algunas citocinas, además de aumentar la expresión de MHCII en superficie.

El propósito de este trabajo es, caracterizar y comparar los efectos de los estímulos generados a través del BCR, CD40 y TLR9 sobre la capacidad de presentación de antígeno de linfocitos B.

## CAPÍTULO DOS

---

### Marco teórico

---

La interacción entre los receptores de linfocitos T y B con sus ligandos marca el inicio de la inmunidad adaptativa. El linfocito B reconoce e interacciona con los antígenos proteicos, generalmente en su forma nativa, por medio de su BCR, que es una forma de inmunoglobulina expresada en su superficie, unida en forma no covalente al dímero  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79a/CD79b).

Por otro lado, los linfocitos T reconocen antígenos por medio de su TCR, complejo heterodimérico, constituido por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , ambas variables, unidas no covalentemente al hexámero transductor de señales CD3. El TCR reconoce péptidos unidos a moléculas del MHC que derivan de antígenos proteicos procesados en el interior de una CPA.

En general, la generación de los ligandos del receptor de los linfocitos T, se lleva a cabo de acuerdo a la localización del antígeno en la CPA. Los antígenos de origen extracelular son internalizados a través de un

sistema de vesículas de la vía endocítica, donde son degradados por los sistemas enzimáticos ahí presentes, mientras que los antígenos localizados en el citosol, son degradados por complejos enzimáticos llamados *proteasomas*.

Los péptidos generados por estos sistemas de degradación son transportados a la superficie celular unidos a moléculas del MHC<sup>5,6</sup>. Existen 2 tipos de moléculas del MHC, las *MHC clase I* (MHCI), presentes en casi todas las células nucleadas y las *MHC clase II* (MHCII), presentes predominantemente en CPAs. En la superficie de la CPAs, las MHCI interactúan con los linfocitos T citotóxicos, caracterizados por expresar CD8, mientras que las MHCII interactúan con linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la mayoría de los cuales tienen función cooperadora.

Inicialmente, las MHCII se sintetizan en ribosomas asociados al *retículo endoplásmico* (RE), donde se unen a la proteína denominada *cadena invariante* (Ii), que tiene diversas funciones, la más importante es como chaperona, guiando el ensamble de las MHCII, al mismo tiempo que impide la unión de péptidos a ellas antes de llegar a la vía endocítica. La cadena Ii forma trímeros, cada uno de ellos capaz de unir tres dímeros de MHCII, dando lugar a un nonámero con una estructura estable, lo que le permite salir del a través del *aparato de Golgi* y de ahí a la *red de transGolgi*, de donde se dirige a los diferentes compartimentos de la vía endocítica gracias a un motivo de dos leucinas (LL) en el dominio citoplásmico de la cadena Ii.

La cadena Ii es degradada en forma progresiva durante el paso de los complejos MHCII-Ii por la vía endocítica, gracias a la acción de proteasas ácidas, especialmente la *cathepsina S*<sup>7,8</sup>. En las CPA existen lisosomas especializados, conocidos como *compartimentos enriquecidos en MHCII* (MIIC, MHCII enriched compartments), en los que la cadena Ii es finalmente degradada, hasta dejar un fragmento proteolítico con los aminoácidos 84-106, conocido como *Péptido de cadena invariante asociado a MHCII* (CLIP, Class II-associated invariant chain peptide), que ocupa el

sitio de unión al péptido en las MHCII. El CLIP es liberado de las MHCII por la MHCII no clásica DM, lo que las deja libres para unir péptidos derivados de las proteínas degradadas en MHC<sup>9</sup>.

Las MHCII con péptidos unidos adquieren una estructura estable, que les permite dirigirse a la membrana plasmática, donde son reconocidas por los TCR de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en un proceso conocido como *presentación antigénica*.

## **2.1** Mecanismos de regulación de la presentación antigénica

La interacción entre la CPA y el linfocito T es una situación esencial, ya que de ella deriva una extensa serie de eventos, entre los que destaca la activación de los linfocitos T, que provoca la secreción de citocinas, además de la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Es tal su importancia, que este evento es minuciosamente regulado a través de diversos mecanismos que lo modulan tanto positiva como negativamente.

Un mecanismo esencial para la activación de los linfocitos T, además de la interacción del TCR con las moléculas del MHC, es el proceso conocido como *coestimulación*, que depende de la expresión de moléculas accesorias en la superficie tanto de la CPA como del linfocito T. La coestimulación sólo ocurre cuando la CPA que participa en esa interacción es una célula dendrítica, un linfocito B ó un macrófago, las cuales, en conjunto, se conocen como *CPA profesionales*.

Durante el reconocimiento de antígeno por un linfocito T en la superficie de una CPA profesional, el TCR, su ligando, los receptores coestimuladores y sus ligandos convergen en el sitio de contacto entre ambas células, conocido como *sinapsis inmunológica*. Las señales coestimuladoras que participan en la sinapsis inmunológica durante la respuesta primaria, son las de los ligandos CD86 (y en menor grado CD80)<sup>10</sup>, con su

receptor CD28, en el linfocito T, la cual aporta señales positivas, críticas para la activación del linfocito T.

Otra interacción importante que modula positivamente la interacción entre la CPA y el linfocito T es la del receptor CD40, una proteína de la familia del receptor del *factor de necrosis tumoral* (TNF, tumor necrosis factor) y su ligando (de la familia del TNF), CD154, expresado por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados. Entre las consecuencias más importantes de esta interacción en los linfocitos B se encuentran el cambio de isotipo de inmunoglobulinas, la inducción de ligandos coestimuladores (CD86, CD80 e ICOSL), moléculas de adhesión y otras implicadas en procesos apoptóticos.

Existen otras señales que modifican funcionalmente a las CPA, de manera que cambian la forma en que interactúan con los linfocitos T. En los linfocitos B, el entrecruzamiento del BCR, por el mismo antígeno, tiene un efecto notable en su capacidad funcional como CPA. El BCR capta e internaliza el antígeno a compartimentos de la vía endocítica, lo cual depende de otras redes de señalización. En breve, la estimulación a través del BCR cambia el patrón de expresión de moléculas en la membrana y aumenta la capacidad de presentación de antígeno por el linfocito B.

Otras moléculas que influyen en la capacidad presentadora de antígeno de los linfocitos B, son los *receptores tipo Toll* (TLR, Toll like receptors), los cuales están distribuidos en diversas células inmunocompetentes. La señalización a través de los TLR, además de inducir procesos inflamatorios, favorece la maduración de las distintas CPA, incluyendo los linfocitos B, en los que induce, entre otros cambios, la expresión de ligandos coestimuladores. En el caso de los linfocitos B, no hay una definición clara de las diferencias en los papeles que juegan en la activación de los TLR y la señal a través de CD40 en su actividad como CPA.

Los distintos TLR señalizan en presencia de diferentes moléculas, la mayoría de ellas derivadas de patógenos. Los mejor caracterizados son los TLR3, que señaliza en presencia de RNA de doble cadena, TLR4,

que lo hace con LPS y TLR9, que es la molécula responsable de los efectos causados por motivos CpG hipometilados, abundantes en el DNA bacteriano.

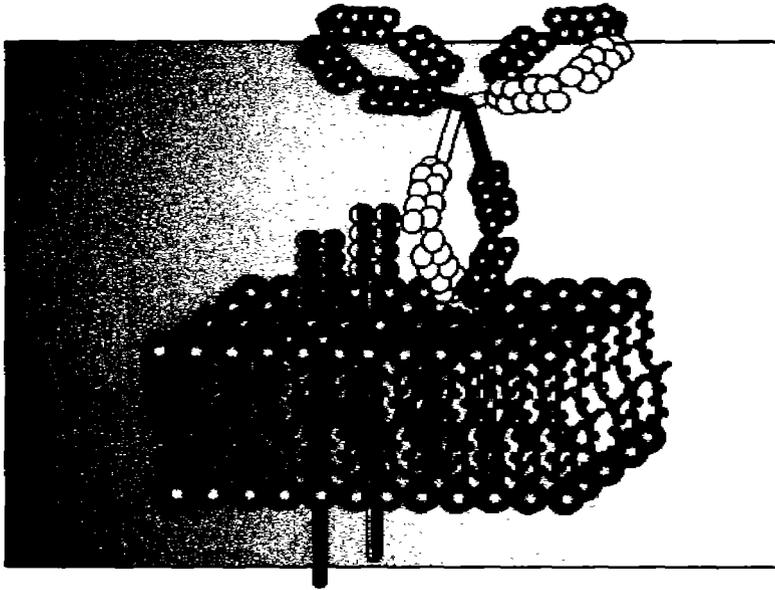
La respuesta de los linfocitos B y la producción de anticuerpos dependen de su interacción, como CPA, con el linfocito T. La capacidad de presentación antigénica del linfocito B es modificada diferencialmente de acuerdo al estímulo secundario recibido. De ahí la gran importancia de conocer el efecto específico de los distintos estímulos recibidos por un linfocito B durante su interacción, como CPA, con los linfocitos T.

## 2.2 El receptor de antígeno del linfocito B.

### 2.2.1. Estructura, expresión y vías de señalización.

El receptor de antígenos del linfocito B es un complejo multiproteico formado por una serie de cadenas ancladas a la membrana celular. La proteína más importante del BCR es una forma transmembranal de los anticuerpos secretados por los linfocitos B<sup>11,12</sup>. Aunque la Ig del BCR es la responsable del reconocimiento antigénico, es incapaz de transducir señales debido a su corto dominio intracelular. La transducción se da a través de un heterodímero asociado al BCR<sup>13</sup>. Este complejo está formado por la cadena Ig $\alpha$  (CD79a)<sup>14</sup>, unida mediante puentes disulfuro a la cadena Ig $\beta$  (CD79b)<sup>15</sup>, asociado no covalentemente al BCR. Las colas citoplásmicas de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  contiene un *motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosinas* (ITAM, Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), que permite la transducción de las señales generadas a partir de la unión del antígeno al BCR<sup>16</sup>.

El evento que determina el inicio de la señalización es el entrecruzamiento del receptor de antígeno<sup>17</sup>. Aún no se conocen con detalle los eventos tempranos debidos al reconocimiento antigénico, aunque se ha descrito que existe una reorganización en la superficie celular, con la



**Figura 2.1: Prototipo estructural del receptor de antígeno de los linfocitos B.** La inmunoglobulina, componente central del BCR, está formado por 2 diferentes pares de cadenas, las L(rojo) y H(amarillo y morado), estas últimas, mantienen unida la inmunoglobulina a la membrana celular mediante un dominio intermembranal y una pequeña cola citoplásmica. La señalización al interior celular es transducida a través de los motivos ITAM en los dominios citoplásmicos de las moléculas CD79a y CD79b(gris y amarillo).

participación de una gran cantidad de moléculas relacionadas con la señalización. Estas incluyen el BCR, la tirosina cinasa (PTK, Protein tyrosine kinase) de Bruton (BTK, Bruton's tyrosine kinase), la PTK de la familia Src Lyn, además de las moléculas MHC<sup>18</sup>, aunque estas últimas podrían estar interactuando en una segunda etapa y su transducción de señales también parece ser mediada por el dímero Ig $\alpha$ -Ig $\beta$ , sin la Ig. Estos cambios ocurren en regiones definidas de la membrana celular

conocidas como *microdominios de membrana* ó *balsas lipídicas*<sup>19</sup>, las cuales son zonas ricas en colesterol y glicoesfingolípidos y se ha propuesto que funcionan como plataformas para la transducción de señales y para el tráfico de membrana<sup>20</sup>.

El entrecruzamiento del BCR provoca la fosforilación de los ITAM de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  lo que resulta en el reclutamiento y activación de la cinasa de tirosina Syk, que participa en la activación de por lo menos tres vías que regulan su proceso de activación, proliferación y diferenciación, que incluyen otras cinasas de tirosina, PLC $\gamma$ -2, GTPasas de la familia Ras (Rac-1), MAP cinasas de las familias JNK, p38 y ERK, así como movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular por PIP3. En este proceso participan proteínas adaptadoras como Grb2, SLP-65 entre otras. Además de Syk, la fosforilación de Ig $\alpha$ - Ig $\beta$  lleva a la activación de Btk, denominada así porque su deficiencia genética lleva a la *hipogammaglobulinemia ligada al cromosoma X* ó *enfermedad de Bruton*. Btk pertenece a la familia Tek y su principal función es fosforilar y activar PLC $\gamma$ 1 y PLC $\gamma$ 2, por medio de la proteína adaptadora SLP-65 (también llamada BLNK), previamente fosforilada por Syk. Ambas fosfolipasas liberan IP<sub>3</sub> y DAG a partir de PIP<sub>2</sub>. El IP<sub>3</sub>, al igual que en los linfocitos T, libera Ca<sup>2+</sup> de sus depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa la vía de las PKC<sup>21-30</sup>.

El resultado final de esta serie de interacciones proteicas es la activación de diversos factores de transcripción, los cuales al ser traslocados al núcleo, inducen una modificación en los perfiles de expresión de varios genes que permiten al linfocito B desarrollar sus funciones efectoras. Entre los genes que se activan, algunos son comunes a otros tipos celulares, necesarios para la mitosis, y otros son específicos de linfocitos B, como inmunoglobulinas, citocinas y receptores de éstas.

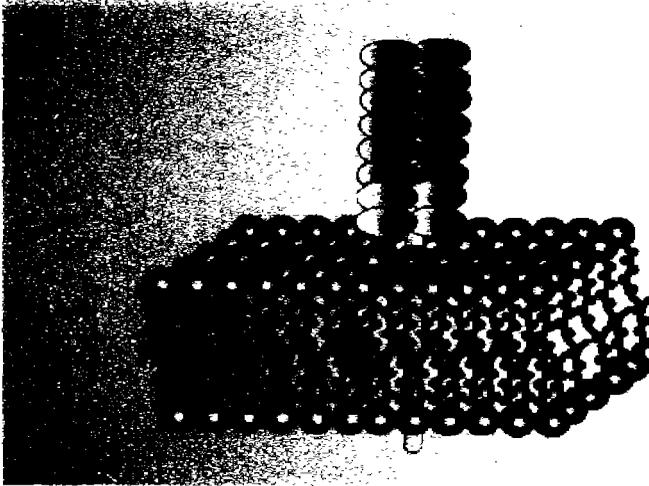
### 2.2.2. Efectos de la activación del linfocito B a través del BCR en la presentación antigénica

La señalización generada por el entrecruzamiento de los BCR afecta algunos aspectos del procesamiento antigénico. El entrecruzamiento del BCR aumenta tanto el procesamiento del antígeno capturado por pinocitosis como la presentación de péptidos que no requieren procesamiento. Así, la señalización generada por el BCR, además de influenciar el procesamiento, afecta la capacidad funcional de los linfocitos B como CPA, en forma independiente del procesamiento de antígeno.

La señalización generada por el BCR afecta el transporte del conjugado BCR-antígeno hacia compartimentos de la vía endocítica. Aunque el BCR transporta constitutivamente al antígeno desde la membrana plasmática hacia los compartimentos MIIC, el entrecruzamiento del BCR incrementa la velocidad de internalización y acelera el transporte intracelular del conjugado BCR- antígeno a los compartimentos de carga de péptido sin alterar la vía de transporte. El efecto en el transporte, pero no en la internalización, se debe a procesos de señalización dependientes del BCR y no a su mera agregación física<sup>31-33</sup>.

## 2.3 El receptor CD40 y su ligando CD154

Los primeros estudios del receptor CD40 fueron sobre el papel de esta molécula en la fisiología del linfocito B, culminando con el descubrimiento de que la inmunodeficiencia conocida como *síndrome hiper-IgM* se debe a una interacción defectuosa entre CD40 y CD154<sup>34-36</sup>.



**Figura 2.2:** *Prototipo estructural de CD40.* Como parte de la familia de TNFr, esta proteína de membrana tipo I, tiene un segmento extracelular de 172 aminoácidos con 4 dominios ricos en cisteína de 45 aminoácidos cada uno, una región transmembranal y un dominio citoplásmico de 61 aminoácidos, responsable de la transducción de señales.

### 2.3.1. Estructura, expresión y vías de señalización de CD40

Como se mencionó, CD40 pertenece a la familia de *receptores de TNF* (TNFr) y es una proteína integral de membrana tipo I, de 277 aminoácidos. Dependiendo de su grado de glicosilación, su peso molecular va de 44 a 50 kDa. Tiene un segmento extracelular de 172 aminoácidos con 4 dominios ricos en cisteína, de 45 aminoácidos cada uno, característicos de la familia del TNFr<sup>37</sup>, una región transmembranal y un dominio citoplásmico de 61 aminoácidos, responsable de la transducción de señales. Hay varias isoformas de CD40, productos de empalme alternativo de su mRNA. Algunas isoformas, incluyendo una deficiente en el dominio citoplásmico, son antagónicas de la señalización de CD40<sup>38</sup>.

CD40 se expresa en una gran cantidad de células, incluyendo todas las CPA, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, epitelio tímico, endotelio vascular, queratinocitos y fibroblastos. También, se ha encontrado en varios tipos de carcinomas como de ovario, nasofaringe, hígado, vejiga y mama. Como otros miembros de la familia de TNFr, las moléculas de CD40 aparentemente se autoasocian en ausencia de ligando mediante sus dominios extracelulares y un *dominio de ensamble y unión pre-ligando* (PLAD, Pre-ligand-binding assembly domain), el cual no participa en la unión al ligando.

Al dominio citoplásmico de CD40 se unen adaptadores de la familia del *factor asociado al receptor del TNF* (TRAF, TNF receptor associated factor), los cuales se conectan con vías de transducción de señales que eventualmente llevan a la activación de los factores de transcripción NFκ-B, AP-1 y NF-AT, a través de tres vías de señalización que incluyen la PI<sub>3</sub>K, y las MAP cinasas p38 y ERK<sup>39</sup>. Dicha asociación modula la actividad de proteínas que afectan el ciclo celular y regulan positivamente factores de supervivencia como Bcl-2 y Bcl-xL que protegen a las células B de la apoptosis. El gen de CD40 es codificado en el brazo largo del cromosoma 20 humano<sup>40</sup>.

CD154 es una proteína integral de membrana de la superfamilia del TNF, de la cual forman parte moléculas como TNF, CD27L, CD30L, ligando de FAS, linfotóxina y otras. El gen CD154, localizado en el cromosoma X, región q26.3-q27.1, consiste de cinco exones y cuatro intrones y codifica una proteína tipo II no glicosilada de 261 aminoácidos con peso de 32-39 kDa. En el extremo carboxilo terminal tiene un dominio extracelular de 215 aminoácidos rico en cisteína, una región transmembranal y un pequeño dominio citoplásmico de 23 aminoácidos. Hay tres isoformas más pequeñas generadas por modificación post-traducciona, una de 31 kDa que carece de dominio citoplásmico, una isoforma soluble 18 kDa que carece de los dominios citoplásmico, transmembranal y parte del extracelular y una de 14 kDa<sup>41,42</sup>. Estas isoformas son capaces

de formar trímeros, activar a CD40 y han sido detectadas en complejos heteromultiméricos con moléculas CD154 completas<sup>43</sup>.

La estructura cristalina del segmento 161-262 de la molécula CD154 soluble indica que la molécula forma un homotrímero<sup>44</sup> muy parecido a la estructura formada por otras moléculas de la superfamilia TNF. La interacción con el receptor CD40 se estabiliza por residuos cargados con el ligando utilizando cadenas laterales básicas y el receptor ácidas. CD154 es expresado únicamente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, incluyendo las subpoblaciones Th<sub>0</sub>, Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>. Aunque se ha publicado que otras células también lo expresan, hacen falta estudios más escrupulosos para poderlo afirmar. La única excepción confirmada son las plaquetas activadas en humanos, pero se ignora si ocurre lo mismo en otras especies.

### 2.3.2. Efectos de la interacción CD154-CD40 en la presentación antigénica.

Mientras que la interacción entre CD154 y CD40 genera *per se* señales de activación para los linfocitos T, los efectos de esta interacción en CPAs dependen del tipo de célula que exprese el receptor, su estadio de maduración y la presencia de otras señales coestimuladoras.

**2.3.2.1 LINFOCITOS B** La activación mediada por CD40 altera las funciones de presentación antigénica por parte de los linfocitos B mediante la inducción de niveles altos de MHCII, además de promover un aumento de algunas moléculas accesorias claves para la activación celular como CD80 y CD86, y moléculas de adhesión como ICAM-1 y CD23<sup>45-48</sup>. Además, esta interacción reorganiza la distribución de los complejos MHC-péptido y moléculas coestimuladoras en la superficie de las CPA, haciéndolas más eficientes<sup>49</sup>.

**2.3.2.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS** La estimulación de células dendríticas a través de CD40 induce aumento en la expresión de MHC I y MHC II y de los ligandos coestimuladores CD80 y CD86 en la superficie celular. Por otro lado, la ligación de CD40 en células dendríticas aumenta la producción de citocinas como IL-12, IL-23, IL-27 que polarizan la respuesta hacia Th<sub>1</sub>, además de que confiere a la célula dendrítica resistencia contra las señales apoptóticas de Fas<sup>50</sup>.

## **2.4** Receptores tipo Toll

Los *receptores tipo Toll* (TLR) son mediadores filogenéticamente conservados de la inmunidad innata esenciales para el reconocimiento microbiano. Hay homólogos en insectos, plantas y mamíferos. En insectos y en mamíferos son proteínas transmembranales, pero en plantas al parecer son proteínas citoplásmicas<sup>51,52</sup>.

El prototipo de este grupo de moléculas es Toll, una proteína encontrada en los inicios de los años 80 necesaria para la inducción del patrón de polarización dorso-ventral en *Drosophila melanogaster*<sup>53</sup>. El gen, clonado en 1988, codifica un receptor transmembranal, cuyo dominio citoplásmico tiene gran similitud con el del receptor de IL-1<sup>54,55</sup>.

En moscas adultas, Toll se asocia a la producción de péptidos antimicrobianos (drosomicina) en infecciones por Gram negativos. Las moscas con mutaciones en Toll no responden bien a una infección fúngica, aunque mantienen la capacidad de responder a infecciones bacterianas.

En 1997, al comparar algunas *secuencias etiquetadas de expresión* (EST, Expressed sequence tag), con la secuencia del gen Toll de *Drosophila melanogaster*, se encontró el primer homólogo en humanos que a la postre sería nombrado TLR4<sup>56</sup>. Actualmente los TLR se reconocen como receptores para una gran variedad de estructuras asociadas a patógenos<sup>57</sup>, pero además reconocen proteínas eucariontes que surgen con el daño celular ó tisular. En este sentido, los TLR deben verse como sensores de

Tabla 2.1: Receptores tipo Toll y ligandos

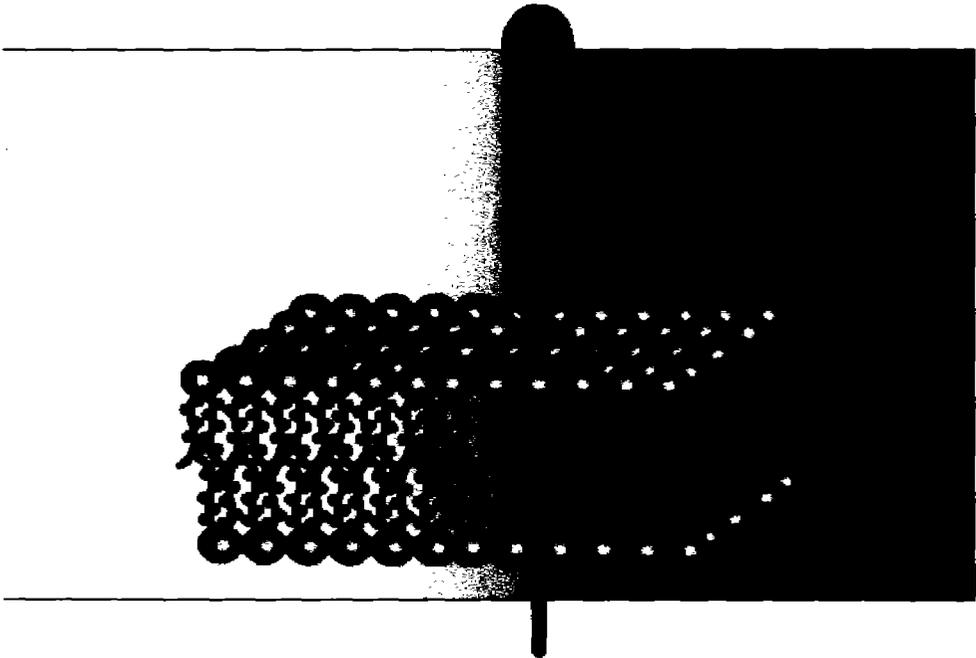
Receptor	Ligando(s) y fuentes
TLR1	Lipopéptidos triacilados (bacterias, micobacterias)
TLR2	Lipoproteínas/lipopéptidos (diversos microorganismos) Peptidoglicanos (Gram positivos) Ácido lipoteicoico (Gram positivos) Lipoarabinomanana (micobacterias) Fosfolípidos de glicoinositol ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) Glicolípidos ( <i>Treponema maltophilum</i> ) Porinas (Neisseria)
TLR3	RNA de doble cadena (virus)
TLR4	LPS (Gram negativos) Proteína de fusión del virus sincicial respiratorio HSP60, HSP70 Dominio repetitivo extra de fibronectina tipo III Oligosacáridos de ácido hialurónico Fibrinógeno
TLR5	Flagelina (bacterias)
TLR6	Lipopéptidos diacilados (micoplasma) (Imiquimod®)
TLR7	loxoribina y bropirimina Imidazoquinolina
TLR8	Moléculas sintéticas pequeñas
TLR9	DNA CpG hipometilado (bacterias)
TLR10	?
TLR11	?

daño. A la fecha, se han encontrado 11 homólogos de Toll en humanos y 11 en ratones, enumerados junto a sus ligandos en la tabla 2.1 (Adaptado de Akira *et al*<sup>58</sup>).

#### 2.4.1. Estructura y mecanismos de señalización de los TLR

Los TLR son proteínas transmembranales tipo I, caracterizados por dominios extracelulares con zonas ricas en leucina, circundadas por zonas ricas en cisteína. Este patrón se encuentra también en la antena adhesiva de una gran variedad de moléculas de la superficie celular<sup>59</sup>. Los TLRs cruzan la membrana citoplásmica una sola vez y su dominio intracelular tiene gran homología con el dominio citoplásmico de la familia de receptores de IL-1 y el del producto del gen R en plantas<sup>60,61</sup>. Este dominio, conocido como Toll/IL-1R (TIR), es esencial para la señalización de estas moléculas y habla de la necesidad de receptores que señalicen a la célula en situaciones de alarma en el organismo, ya sea de origen exógeno (receptores tipo Toll) ó endógeno (IL-1)<sup>62,63</sup>.

En mamíferos, la transducción de señales de los TLR, inicia con la unión entre el ligando microbiano y el TLR. Las interacciones homotípicas en el interior de la célula dan lugar a la formación de nuevos dominios donde se une la proteína adaptadora MyD88<sup>60</sup>. Posteriormente, el dominio de muerte del Factor 88 de diferenciación mielóide, MyD88, interactúa con el dominio de muerte de la *proteína cinasa asociada al IL-1R* (IRAK, IL-1R associated kinase). Este complejo receptor desencadena una vasta red de interacciones, esquematizadas en la figura 2.3 que culminan con la activación de factores de transcripción como NF $\kappa$ -B y c-Jun. Otra vía independiente de MyD88, lleva a la activación de los factores de transcripción IRF3 e IRF7 (*Factor 3 y 7 de Regulación de IFN*), que inducen transcripción de genes de *interferones* (IFN) tipo I, especialmente IFN- $\gamma$ . Esta segunda vía, pero no la primera, es esencial en la activación de CPA por la inmunidad innata.



**Figura 2.3:** Prototipo estructural de la familia de Receptores tipo Toll. Al igual que otros TLRs, TLR9 contiene un motivo rico en leucinas en el dominio extracelular y un dominio TIR citoplásmico. El dominio TIR tiene una gran homología con el receptor IL-1R. A diferencia de otros TLRs, TLR-9 es expresado principalmente en el citoplasma y por lo tanto se requiere la ingesta de CPG-ODN para la activación celular.<sup>64</sup>

**Tabla 2.2:** Principales diferencias entre el DNA de organismos vertebrados e invertebrados

DNA en vertebrados	DNA en bacterias y Virus
Supresión de motivos CpG	Proporción aleatoria normal de motivos CpG
Metilación del 80% de motivos CpG (Posición 5 de la citosina)	Nivel de metilación muy baja de motivos CpG
Secuencias inhibitorias en la mayoría de los motivos CpG (XXXCCpGGXXX)	

#### 2.4.2. Reconocimiento de CpG-DNA por TLR9

El DNA bacteriano, el de organismos invertebrados y el de algunos virus, como el virus *Herpes simplex* tipo I (HSV-1) difieren estructuralmente del DNA de organismos vertebrados. El DNA bacteriano muestra la frecuencia aleatoria esperada de dinucleótidos CpG (1:16) mientras que esta frecuencia es de un 25% de la esperada en el genoma de organismos vertebrados. Otra diferencia importante es que el 80% de los motivos 5'-CpG-3' se encuentran metilados en el DNA eucarionte mientras que en el DNA bacteriano no existe este nivel de metilación.

Con base en los trabajos pioneros de Yamamoto<sup>65</sup> y Krieg<sup>66</sup>, en la actualidad se acepta que debido a estas diferencias estructurales, los motivos CpG no metilados en el DNA bacteriano ó en los oligodesoxinucleótidos sintéticos, activan directamente linfocitos B<sup>66,67</sup>, macrófagos<sup>68</sup> y células dendríticas<sup>69</sup>.

Sin embargo, el nivel de inmunoestimulación de un motivo CpG-DNA depende en gran medida de las bases que se encuentran alrededor del dinucleótido. Después de una intensa búsqueda, se ha llegado a la conclusión de que los motivos CpG óptimos para activar las células inmunes de ratón y conejo tienen la fórmula general purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina; el motivo más inmunoestimulante encontrado a la fecha es GACGTT.

En humanos el motivo CpG más inmunoestimulante es GTCGTT, aunque se ha sugerido que las células T y las células NK humanas podrían responder a distintos tipos de motivos CpG<sup>70</sup>. El motivo GTCGTT es óptimo también para muchas especies de vertebrados.

Otro factor importante para el efecto inmunoestimulante de los motivos CpG es el esqueleto que conforma la secuencia de DNA. Los oligodesoxinucleótidos con el esqueleto normal (P-O), son rápidamente degradados dentro de los linfocitos<sup>71</sup>, reduciendo su capacidad de promoción de la proliferación de las células B y provocando resultados ambiguos en ensayos de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. El esqueleto fosforotioato (P-S) provee al motivo CpG de una resistencia a nucleasas muy alta además de aumentar la unión de *oligodesoxinucleótidos* (ODN, oligodeoxynucleotides) no específicos a proteínas de membrana logrando un aumento en la capacidad de internalización y por consiguiente aumentando la capacidad estimulante aproximadamente 200 veces. Esta modificación química no ocurre en forma natural. Sin embargo, es una herramienta para poder utilizar secuencias CpG como adyuvantes de alta eficiencia.

La modificación química del esqueleto P-S crea un centro quiral en la unión entre 2 nucleótidos. Por lo tanto un ODN de 20 bases tiene 19 centros quirales, dando 2<sup>19</sup> centros quirales distintos (aproximadamente 100,000). In vivo, el S-isómero es altamente resistente a nucleasas pero el R-isómero es degradado a una velocidad mayor que los ODN con esqueleto P-O. Consistentemente con sus diferencias en la estabilidad,

los CpG sintetizados con un esqueleto R son inductores menos potentes de la proliferación de las células B.

Se ha propuesto una clasificación basada en las diferencias estructurales anteriormente mencionadas y las células que son activadas por cada ODN:

- **CpG-A-ODN.** Este tipo de ODN se caracteriza estructuralmente por motivos poli-G con uniones P-S en los extremos 5' y 3' y una secuencia palindrómica que contiene el motivo CpG unido mediante P-O al centro del ODN. Los ODN que contienen esqueletos P-O son particularmente efectivos en la activación de células NK y en la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los precursores de las células dendríticas plasmacitoides.
- **CpG-B-ODN.** Se caracteriza estructuralmente por uno ó más motivos CpG montados sobre un esqueleto de P-O, no contiene motivos poli-G. El esqueleto de P-S da una resistencia a nucleasas que los hace ideales para la activación de células B.

En trabajos posteriores se confirmó la relación entre la expresión de TLR9 en células inmunes y la capacidad de respuesta hacia DNA bacteriano<sup>72</sup>.

#### 2.4.3. Efectos de la interacción de TLR9 con su ligando

En general, los CpG-DNA son capaces de activar diferentes tipos celulares, como células dendríticas, linfocitos B, monocitos y macrófagos y células NK, independientemente de si es DNA genómico u oligodesoxinucleótidos sintéticos con un esqueleto PS resistente a nucleasas. En todos los tipos celulares, el DNA con motivos CpG tiende a inducir una respuesta de tipo Th<sub>1</sub><sup>73</sup>

**2.4.3.1 LINFOCITOS B** El motivo CpG-DNA es un mitógeno muy potente para linfocitos B en todos los organismos vertebrados estudiados. Tanto el DNA bacteriano como el CpG-B- DNA inducen la entrada

de linfocitos B en la fase G1 del ciclo celular y secreción de IL-6 e IL-10 en pocas horas, pero los motivos poli-G del CpG-A- DNA tienen un efecto inhibitorio en linfocitos B. La expresión de IL-6 inducida por los motivos CpG es muy importante para activar la secreción de IgM por ellos mismos.

Además de secretar citocinas e Ig, los linfocitos B activados por CpG-DNA aumentan la expresión del receptor Fc $\gamma$ , MHCII y las moléculas de coestimulación CD80 y CD86. En linfocitos B humanos hay aumento en la expresión no sólo de estas moléculas coestimuladoras, sino también de CD40. Los motivos CpG también activan linfocitos B malignos de pacientes con leucemia linfocítica crónica, induciéndolos a entrar al ciclo celular, secretar citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) y regular la expresión de las moléculas de superficie CD40, CD58, CD80, CD86, CD54 y MHCI.

En linfocitos B maduros en la periferia, las concentraciones bajas de CpG-DNA sinergizan fuertemente con las señales del BCR, aumentando la proliferación de linfocitos B, secreción de Ig e IL-6. Esta sinergia es tan fuerte, que el entrecruzamiento multivalente del BCR puede interactuar con CpG-ODN metilados y ODN sin motivos CpG, provocando proliferación de linfocitos B y secreción de Ig, aunque con menor eficiencia que el ODN con motivos CpG.

# CAPÍTULO TRES

---

## Hipótesis y Objetivos

---

### **3.1** Justificación

La presentación de antígenos es un evento crucial en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Dada su importancia existen diferentes mecanismos de modulación que regulan la interacción entre las CPAs y los linfocitos T durante la sinapsis inmunológica. Uno de los mas importantes es a través de moléculas de coestimulación. En el caso de los linfocitos B como CPA, la molécula CD40 y su ligando en los linfocitos T, CD154 , son las moléculas coestimuladoras mejor caracterizadas.

Además de CD40, existen otros estímulos que promueven la activación celular como es el caso de los receptores tipo Toll, específicamente TLR9, ya que su ligando, el DNA bacteriano promueve la activación de los linfocitos B, o el propio BCR, involucrado en la internalización antigénica, aunque la relevancia de estas tres moléculas en la función del linfocito B como CPA no ha sido estudiada a detalle.

El propósito de este trabajo es comparar el efecto de la estimulación a través de CD40, TLR9 y BCR sobre los linfocitos B como CPA utilizando como modelo la línea celular de linfocitos B murinos LK35.2.

### **3.2 Planteamiento del problema**

¿Cuáles son los papeles específicos de la señalización mediada por CD40, BCR y TLR9 en la función del linfocito B como CPA?

### **3.3 Hipótesis**

En linfocitos B, la señalización a través de TLR9 y BCR promueve la expresión de moléculas coestimuladoras y es sinérgica con la estimulación a través de CD40 en la presentación de antígenos exógenos.

### **3.4** Objetivos

Determinar los efectos generales de la señalización a través de BCR, CD40 y TLR9 sobre los linfocitos B en su función de CPA.

### **3.5** Objetivos Particulares

- Determinar la expresión en superficie de CD80, CD86 ICAM-1, MHCII y CD40 en hibridomas de linfocitos B, LK35.2, activados a través del BCR, CD40 y TLR9.
- Determinar la eficiencia de endocitosis de antígeno en hibridomas de linfocitos B, LK35.2, activados a través del BCR, CD40 y TLR9.
- Determinar la capacidad de presentación de antígenos en hibridomas de linfocitos B, LK35.2, activados a través del BCR, CD40 y TLR9.

# CAPÍTULO CUATRO

---

## Material y Métodos

---

### **4.1** Reactivos

**4.1.1. Líneas celulares** En todos los estudios, se utilizó como CPA, el hibridoma murino de linfocitos B LK-35.2, el cual deriva de la fusión somática del linfoma A20.2J (H2<sup>d</sup>) con células de bazo de ratones B10.BR (H2<sup>k</sup>).

Para los ensayos de presentación antigénica, como linfocitos T complementarios se utilizaron los siguientes hibridomas de linfocitos T:

- TS12, reconoce el péptido 42-56 de RNAsa unido a IA<sup>k74-76</sup>.
- A6.B3, donado por la Dra. Laurie Glimcher (Escuela de Medicina, Universidad de Harvard), reconoce el péptido 34-45 de la *lisozima de huevo de gallina* (HEL, Hen egg lysozyme) unido a IA<sup>k77</sup>.

- *CTLL-2*, es una línea de linfocitos T citotóxicos derivadas de un ratón C57BL/6, dependiente de IL-2 para su crecimiento y se utilizan para la detección de esta citocina por bioensayo<sup>78</sup>.

**4.1.2. Anticuerpos** Para la activación celular, en todos los ensayos se utilizaron los siguientes anticuerpos agonistas:

- *anti-CD40*, anticuerpo comercial, BD Pharmingen®
- *anti-IgG*, para activar las CPA se utilizó la fracción F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo comercial conejo anti-ratón. (Jackson ImmunoResearch®)
- *anti-Mac-1*. Producto del cultivo del hibridoma 70.15.11.5 (ATCC), el cual secreta un anticuerpo con isotipo IgG2b, el cual reconoce la proteína CD11b. El anticuerpo se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A.
- *anti-CD45*, BD Pharmingen®, Conjugado con *Isotiocianato de fluoresceína* (FITC, fluorescein isothiocyanate)

Para la determinación de moléculas en superficie se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- *anti-CD40*, producto del hibridoma 1C10 generado por la fusión del mieloma murino Ag8 con linfocitos B de una rata inmunizada con el dominio extracelular de CD40 murino expresado en células COS7. El anticuerpo agonista 1C10 con isotipo IgG2a Kappa, mimetiza a la proteína gp39/CD40L en su capacidad estimulante de linfocitos B.
- *anti-CD80*, BD Pharmingen®, Conjugado con FITC
- *anti-CD86*, BD Pharmingen®, Conjugado con Alexa®

□ *anti-MHCII*, Producto del cultivo del hibridoma 10.2.16, el cual secreta un anticuerpo monoclonal IgG2b el cual reconoce la MHCII IA<sup>k</sup>. El anticuerpo se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A y se conjugó con biotina. Para revelar esta tinción se uso el conjugado estreptavidina-Ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch<sup>®</sup>, WestGroove, PA)

□ *anti-ICAM-1*, BD Pharmingen<sup>®</sup>, Conjugado con biotina

**4.1.3. Oligodesoxirribonucleótidos** Los oligos utilizados para la activación celular, fueron sintetizados por Organon<sup>®</sup>. El CpG-ODN 1826 de 20 nucleótidos tiene la secuencia: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3', con los dinucleótidos CpG subrayados y tienen un esqueleto fosforotioato resistente a nucleasas y el cual contiene un par de motivos CpG que tienen un efecto inmunoestimulante en ratones<sup>79</sup>. Por otro lado la secuencia ODN control una secuencia muy parecida al ODN-CpG-1826 excepto por los CpGs invertidos, consta de 20 nucleótidos con un esqueleto fosforotioato 5'-TCC ATG AGC TTC CTG AGT CT-3', no contiene ningún motivo inmunoestimulante para linfocitos B murinos<sup>80</sup>.

## 4.2 Metodologías

**4.2.1. Cultivos celulares y activación de Linfocitos B** Las cultivos celulares se mantuvieron en condiciones de incubación estándar<sup>81</sup>, con medio RPMI 1640, suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, glutamina, HEPES, obtenidos de Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, 10 % de suero fetal bovino (SFB) HyClone<sup>®</sup> (Logan, UT) y Ciproxina, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, manteniendo una densidad celular máxima de  $\approx 2 \cdot 10^5$  cel/ml.

La activación de las células LK-35.2 se realizó en placas de cultivo de 6 pozos de fondo plano a una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  cel/ml y en

un volumen de 2 ml de medio RPMI suplementado de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 4.1:

**Tabla 4.1:** *Condiciones de activación de los linfocitos B*

Condición	[Final]
anti-CD40	10 µg/ml
anti-IgG	10 µg/ml
anti-Mac-1	10 µg/ml
CPG-ODN	0.1 µM
DNA Control	0.1 µM

**4.2.2. Determinación de antígenos de superficie por inmunofluorescencia**

de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer antígenos de membrana que permiten:

La técnica de inmunofluorescencia por citometría de flujo se basa en la detección de antígenos presentes en la membrana de las células. Para ello se aprovecha la existencia

- Reconocer una población celular.
- Identificar las células efectoras de una determinada función.
- Estudiar el grado de activación de una población celular.

Dependiendo de la metodología utilizada, se divide en inmunofluorescencia directa e indirecta:

- ❑ *Inmunofluorescencia directa.* Son las que emplean anticuerpos a los que se ha conjugado directamente un fluorocromo.
- ❑ *Inmunofluorescencia indirecta.* En estas técnicas el anticuerpo que reconoce el antígeno no está marcado sino que se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con el fluorocromo y dirigido contra la especie del primero. Una variante de estas técnicas es la que utiliza el primer anticuerpo conjugado con biotina y posteriormente se añade avidina o estreptavidina conjugada con el fluorocromo.

Por lo que se refiere a los marcajes, estos pueden ser sencillos (sólo se estudia un marcador) o dobles/múltiples (estudio simultáneo de varios marcadores). En este último caso los anticuerpos que reconoce cada marcador deben ir conjugados con fluorocromos (que emitan a diferente longitud de onda y que sean compatibles con los detectores disponibles).

Para examinar los cambios en la expresión de los antígenos de superficie de los linfocitos B, se utilizó el protocolo descrito por Clatza *et al*<sup>82</sup>. Se incubaron  $5 \cdot 10^5$  células provenientes de un cultivo en fase logarítmica con 100  $\mu$ l del reactivo correspondiente durante 30 minutos y a una temperatura de 4 °C de acuerdo a la tabla 4.2.

En las tinciones indirectas, se realizaron dos lavados centrifugando posteriormente la suspensión celular durante 3 min a 1500 RPM y resuspendiendo el botón celular en solución isotónica (*Solución tampón de fosfatos* (PBS, Phosphate-buffered saline) + 1 % SFB + 0.5 %  $\text{NaN}_3$ ) fría. En seguida, las células se incubaron durante 30 minutos adicionales con el reactivo secundario, estreptavidina- ficoeritrina (Jackson Immuno-Research®, WestGroove, PA) en el caso de los anticuerpos biotinilados y anti-rata-FITC en el caso del anticuerpo anti-CD40(anti-ratón). Posteriormente se realizaron tres lavados más con la misma solución. Por último, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FacsCalibur® (Becton Dickinson®, San José, CA).

Tabla 4.2: Determinación de antígenos en la superficie de linfocitos B activados

Antígeno a Determinar	Anticuerpo	[Final]
CD40	CD40(anti-ratón)	1:200
CD80	CD80-FITC	1:200
CD86	CD86-Alexa®	1:200
MHCII	MHCII-biotina	1:100
ICAM-1	ICAM-1-biotina	1:200

Para su análisis, se calculó la *Intensidad media de fluorescencia relativa* (IMFr), obtenido de la comparación de la IMF de las células activadas contra la IMF de su respectivo control de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IMFr} = \frac{\text{IMF células estimuladas}}{\text{IMF células sin estímulo}}$$

**4.2.3. Estudios de Endocitosis de Antígeno** Se adaptó el método de internalización anti-génica<sup>81</sup>, utilizando como antígeno una proteína marcada con un fluorocromo, lo que nos permitió utilizar una técnica de fluorescencia por citometría de flujo para revelar el experimento. El método se describe a continuación.

En placas de 96 pozos con fondo plano Costar en un volumen de 2 mL, se realizó un cultivo de  $2.5 \cdot 10^5$  células LK-35.2 y para cada condición se adicionó el reactivo correspondiente de acuerdo a la tabla 4.1.

Se realizaron estudios cinéticos hasta por 24 horas de incubación, con controles sin incubación. Después de la incubación, se tomaron  $2 \cdot 10^5$  células y se lavaron con PBS-SFB frío (4 °C) y se incubaron en un volumen de 100  $\mu$ l de HEL-FITC a una concentración de 2 mg/ml en las cinéticas de 0 y 3 horas.

Después de la incubación, se lavaron tres veces con 500  $\mu$ l de solución isotónica (PBS-SFB + 0.5 %  $\text{NaN}_3$ ) a 4 °C para inhibir la endocitosis. Por último, se lavaron con PBS-SFB sin  $\text{NaN}_3$  y se determinó la captación de HEL-FITC en un citómetro de flujo FACScalibur®.

La HEL se marcó utilizando un protocolo estándar de marcaje de proteínas con isotiocianato de fluoresceína<sup>81</sup>. Después del marcaje, nos aseguramos que la HEL era internalizada de la misma manera que antes de marcar.

**4.2.4. Estudios de presentación de antígeno** Esta técnica nos permite evaluar el grado de activación de los linfocitos T al interactuar con una CPA complementaria. La activación de los linfocitos T promueve la producción y posterior liberación de IL-2 al medio. Puesto que la cantidad de interleucina producida es proporcional al grado de activación de los linfocitos T, al cuantificarla mediante el ensayo radiométrico de incorporación de timidina, indirectamente se cuantifica la presentación antigénica.

Para activar las células LK35.2 se siguió un esquema idéntico al utilizado para el ensayo de endocitosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se fijaron las células con paraformaldehído al 1 % para resuspenderlas en RPMI-1640 frío a una concentración de  $2.5 \cdot 10^5$  cel/ml. Simultáneamente, se cosecharon los hibridomas T en fase logarítmica y se suspendieron en RPMI frío a una concentración de  $5 \cdot 10^5$  cel/ml.

Posteriormente se cocultivaron  $2.5 \cdot 10^4$  CPA activadas con  $5 \cdot 10^4$  células T en cajas de cultivo de 96 pozos, adicionándoles el antígeno específico de cada hibridoma. Este procedimiento se utilizó para cada una

de las condiciones de activación de linfocitos B, con el hibridoma A6.B3 utilizando tres diferentes concentraciones del péptido 34-45 de HEL 0 y TS12, con tres concentraciones del péptido de RNAsa bovina (0, 0.03, 0.1, 0.3).

Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se recolectó el sobrenadante para su uso en un ensayo de determinación de IL-2.

Para su análisis, se calculó el cambio en *cuentas por minuto*  $\Delta$ CPM (CPM, Counts per minute), obtenido de la diferencia entre las CPM de las células estimuladas y las CPM de las células no estimuladas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta\text{CPM} = \text{CPM células estimuladas} - \text{CPM células sin estímulo}$$

#### 4.2.5. Estudio de incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ )

Esta técnica se basa en el hecho de que las células CTLL-2 dependen de la presencia de IL-2 para su reproducción. Al cultivarlas en presencia de IL-2, las células CTLL-2 comienzan a proliferar, promoviendo la replicación del material genómico a partir de bases nitrogenadas. Al agregar timidina marcada radioactivamente al medio, esta se incorporara al material genómico sintetizado *de novo*. Puesto que la incorporación de esta base nitrogenada al DNA es proporcional a la proliferación celular provocada por la IL-2, al analizar las células en un contador de centelleo se cuantifica indirectamente la cantidad de esta molécula presente en el medio.

Se utilizo una metodología estándar<sup>81</sup> descrita a continuación: Del sobrenadante recolectado del ensayo de presentación de antígeno, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  y se colocaron en una placa de cultivo con 100  $\mu\text{l}$  de una

suspensión  $1 \cdot 10^5$  células CTLL-2/ml, previamente lavadas con medio RPMI-1640 suplementado. Se incubaron a 37 °C por 24 horas y después se adicionó 1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-TdR y se continuó la incubación por 10 horas más en condiciones semejantes. Una vez concluida la incubación, se analizaron las muestras en un contador de centelleo.

# CAPÍTULO CINCO

---

## Resultados y Análisis

---

**5.1** La estimulación a través de CD40, BCR ó TLR9 en forma independiente aumenta la expresión de CD80, sin afectar la expresión de CD86, MHCII, ICAM-1 en la superficie de células LK- 35.2

El cambio en la expresión de moléculas que intervienen en la sinapsis inmunológica es uno de los mecanismos de modulación de la actividad de la CPA más importantes. De acuerdo a su función, se clasifican en dos grupos principales: moléculas de coestimulación y moléculas de adhesión.

Las moléculas de adhesión estabilizan la interacción entre el TCR y el complejo MHC-péptido, mientras que las moléculas de coestimulación representan la segunda señal en el proceso de activación de los linfocitos.

Así, se decidió examinar el cambio en la expresión de moléculas de importancia para los linfocitos B en su función de CPA (CD80, CD86, MHCII, ICAM-1 y CD40) en el hibridoma de B, LK35.2, activado a través de CD40, BCR y TLR9. Para tal efecto, se realizaron estudios de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos, los cuales fueron posteriormente analizados mediante citometría de flujo.

En los estudios se incluyó como control negativo, un anticuerpo contra la proteína CD45 ya que una gran cantidad de reportes indican que en los linfocitos B, el nivel de expresión de esta molécula es constante aún en condiciones de activación, por lo que resulta un control adecuado para el monitoreo del sistema experimental. Otros controles incluidos fueron, el anticuerpo dirigido contra CD11b (Mac-1), molécula que no se expresa por los linfocitos B, la cual se utiliza como control de isotipo y un ODN cuya secuencia no contiene motivos CpG. Ambos controles son útiles en la identificación de posibles interferencias asociadas al sistema o a los métodos utilizados. Para evaluar la precisión, estos estudios se realizaron por duplicado, aunque de forma independiente, obteniendo resultados similares en ambos experimentos.

Como se observa en las figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4, el cambio en la expresión de la mayoría de las moléculas estudiadas con respecto a su expresión basal es muy pequeño, en algunos casos la diferencia es de tan solo el  $\pm 10\%$ . La expresión de las moléculas control (CD45 y Mac-1) presenta un comportamiento similar al de las moléculas en estudio, con cambios de magnitud en el rango de  $\pm 10\%$  con respecto a las células sin estimulación y con una tendencia totalmente aleatoria. Se reporta en la literatura que la activación de la CPA independientemente del estímulo utilizado no altera la expresión de la proteína CD45, mientras que en el caso de Mac-1, la molécula no es expresada por linfocitos B, por lo que no debería de existir respuesta al estimular a los linfocitos B a través de esta molécula.

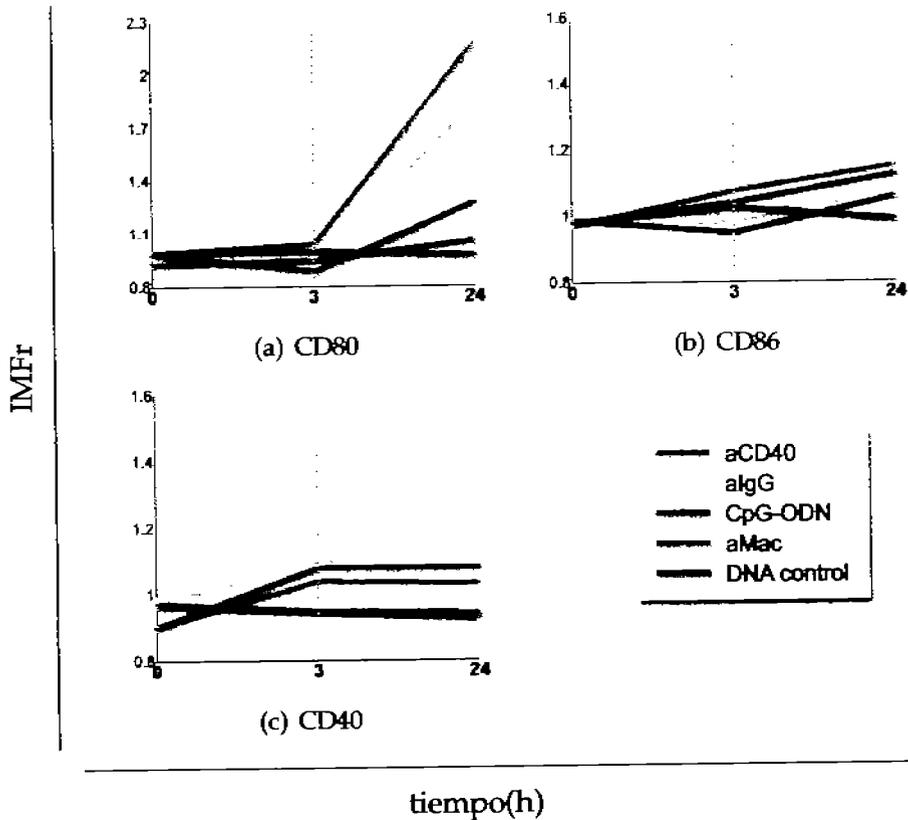
De lo anterior, podemos deducir que el cambio observado ( $\pm 10\%$ ) en la expresión de las moléculas control es provocado por factores inherentes al sistema o al método utilizado y no a un cambio en la expresión de CD45 y Mac-1. Resulta evidente que en el caso de las moléculas en estudio, cambios de hasta  $\pm 10\%$  en la expresión con respecto a la basal son causados también por los mismos factores inherentes al diseño experimental y por lo tanto no son considerados importantes.

- **Expresión de CD80.** La expresión de CD80 y CD86 se examinó debido al importante papel regulador de ambas proteínas sobre la respuesta inmune adaptativa y en particular sobre la presentación antigénica. Ambas proteínas forman parte de la familia B7, la cual está relacionada estructural y funcionalmente con el receptor CD28. Los miembros de la familia B7 tienen una función dual como ligandos, en el caso específico de CD80 y CD86 como factores de activación importantes del linfocito T cuando se une a CD28 (CD86 predominantemente) y actuando como reguladores negativos al unirse a CTLA-4 (CD80 predominantemente).

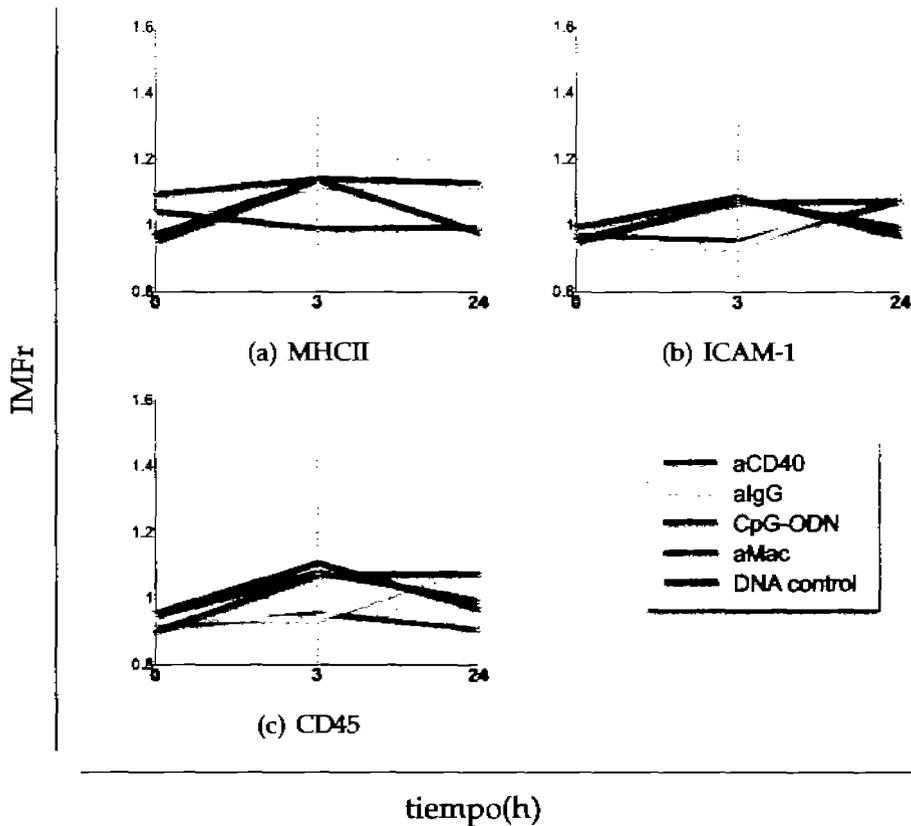
Como se observa en la figura 5.1(a), la expresión de CD80 en linfocitos B estimulados independientemente durante tres horas a través de CD40, BCR ó TLR9 se mantiene constante en cualquiera de las tres condiciones, pero si la estimulación continúa hasta 24 horas, se observa un patrón de expresión diferente en cada condición.

En el caso de la estimulación a través de TLR9, ésta produjo un aumento en la expresión de CD80 de aproximadamente 20%, aunque existe un aumento visiblemente mayor en el caso de la estimulación a través del BCR(90%). La estimulación a través de CD40 provocó un aumento de más del doble (120% aproximadamente) en la expresión de CD80 comparado con la expresión basal.

- **Expresión de CD86.** En la figura 5.1(b), se observa que a diferencia de la expresión de CD80, el efecto de los diferentes estímulos sobre la expresión de CD86 es poco significativo, manteniéndose prácticamente constante para todos los estímulos durante las primeras tres horas de activación. Después de 24 horas de estimulación se observa un ligero aumento(aproximadamente 15%) en la expresión de CD86 en las células activadas a través de CD40, mientras que la expresión en linfocitos activados a través del BCR y TLR9 se mantuvo prácticamente constante.
- **Expresión de CD40.** Independientemente de ser uno de los receptores utilizados como fuente de estimulación en estos estudios, se examinaron los cambios en la expresión de CD40 por células LK-35.2 bajo diferentes condiciones. En la figura 5.1(c) se observa que independientemente del estímulo utilizado, no existen cambios significativos en la expresión de CD40 en linfocitos B, durante las 24 horas de estimulación.
- **Expresión de MHCII.** La expresión de MHCII fue evaluada dada su importancia en la interacción entre los linfocitos T y las CPAs. Una variación sutil en su expresión derivaría en cambios radicales en la activación de ambas células. En la figura 5.2(a), se observa que al estimular durante 24 horas, los linfocitos B no modifican la expresión de MHCII independientemente del estímulo.
- **Expresión de ICAM-1.** Otra molécula evaluada fue ICAM-1, una molécula de adhesión que ayuda a mantener la unión entre el linfocito T y el linfocito B durante la sinapsis inmunológica. En la figura 5.2(b) se observa que los linfocitos B estimulados durante tres horas a través de CD40, BCR y TLR9 no aumentan la expresión de ICAM-1, manteniéndose sin cambio hasta las 24 horas.



**Figura 5.1: Expresión de CD80, CD86 y CD40 en linfocitos activados con estímulos independientes.** Se incubaron  $1 \cdot 10^6$  células durante 3 y 24 horas en las siguientes soluciones: anti-CD40( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-IgG( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-Mac-1( $10\mu\text{g/ml}$ ), CPG-ODN( $0.1\mu\text{M}$ ) y DNA-control( $0.1\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: CD80-FITC(1:200), CD86-Alexa<sup>®</sup>(1:200), MHCII-biotina(1:100) e ICAM-1-biotina(1:200). En el caso de los anticuerpos biotinilados, las células se incubaron durante 15 minutos adicionales con soluciones de estreptavidina-PE(1:500) y estreptavidina-FITC(1:200). El resultado se expresa como Intensidad media de fluorescencia relativa(IMFr), de acuerdo a la fórmula siguiente:  $\text{IMFr} = \text{IMF cels. estimuladas} / \text{IMF cels. sin estimular}$ .



**Figura 5.2: Expresión de MHCII, ICAM-1 y CD45 en linfocitos bajo estímulos independientes.** Se incubaron  $1 \cdot 10^6$  células durante 3 y 24 horas en las siguientes soluciones: anti-CD40(10 $\mu$ g/ml), anti-IgG(10 $\mu$ g/ml), anti-Mac-1(10 $\mu$ g/ml), CPG-ODN(0.1 $\mu$ M) y DNA-control(0.1 $\mu$ M). Posteriormente, las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: CD80-FITC(1:200), CD86-Alexa<sup>®</sup>(1:200), MHCII-biotina(1:100) e ICAM-1-biotina(1:200). En el caso de los anticuerpos biotinilados, las células se incubaron 15 minutos adicionales con soluciones de estreptavidina-PE(1:500) y estreptavidina-FITC(1:200). El resultado se expresa como Intensidad media de fluorescencia relativa(IMFr), de acuerdo a la fórmula siguiente:  $IMFr = IMF \text{ cels. estimuladas} / IMF \text{ cels. sin estimular}$ .

- **Expresión de CD45.** La última molécula analizada fue CD45, una PTP transmembranal que actúa como contraparte eliminando los grupos fosfatos añadidos por la cinasa Csk. La expresión de esta molécula es constitutiva, no es afectada por la activación de los linfocitos B, por lo que es usada como un control en este experimento. Se observa en la figura 5.2(c) que en los linfocitos B la expresión de CD45 no varía durante las 24 horas de estimulación bajo ninguna de las condiciones utilizadas.

Como se mencionó anteriormente, uno de los efectos de la activación de las CPAs, es la regulación de la expresión de moléculas de coestimulación y de adhesión en la membrana celular.

En los linfocitos B, una de las moléculas de coestimulación mejor caracterizadas es CD40, la cual al unirse a su ligando regula la expresión de otras moléculas de coestimulación y de adhesión entre las que se encuentra CD80, CD86 e ICAM-I. La importancia de CD40 como molécula coestimuladora se refleja en el hecho de que la estimulación a través de CD40 tiene como resultado una modificación en el patrón de expresión de otras moléculas involucradas en la respuesta inmune. Del mismo modo se infiere que la estimulación a través del BCR y TLR9 funcionan como vías de coestimulación en los linfocitos B y que un posible mecanismo de acción se lleva a través de la modulación de la expresión de otras moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Otro punto que es importante señalar es que la señalización a través de CD80 es un mecanismo general de coestimulación de gran importancia para los linfocitos B, ya que la expresión de esta molécula aumenta, aunque en diferente magnitud, por la estimulación a través de los tres estímulos utilizados (CD40, BCR y TLR9).

Al igual que con CD80, en la literatura se reporta que la expresión de CD86 en linfocitos B activados, sufre un cambio significativo con respecto a linfocitos no estimulados. El hecho de que experimentalmente la expresión de la molécula CD86, no se modifique con ninguno de los

estímulos, se puede explicar por el hecho de que en este estudio se utilizó una línea celular (LK35.2) como CPA.

Para obtener una línea celular a partir de células normales, se sigue una metodología que puede afectar entre otras cosas, la maquinaria biosintética de las células. En particular en la línea celular LK35.2, se ha visto en estudios anteriores que no existen cambios significativos en la expresión de CD86 al ser activadas a través de CD40, por lo que es muy probable que el mismo efecto suceda al activar las células a través del BCR y de TLR9.

Además, en los linfocitos B normales que no han sido estimulados no expresan moléculas CD86 en la superficie celular, la expresión de CD86 tiene su máximo una hora después de ser estimulados a través de CD40. En el caso de las células LK35.2 se ha visto que aun en células no estimuladas, la expresión basal de CD86 es alta y que esta no se ve modificada al estimular las células a través de CD40.

El hecho de que la expresión de CD80 sea modulada en linfocitos B estimulados a través de CD40, BCR y TLR9, no necesariamente indica que este sea el único mecanismo por el cual sea activada esta CPA. Es muy probable, que los linfocitos B utilicen otros mecanismos diferentes de la modulación de las moléculas en superficie para lograr la activación celular.

## **5.2 La estimulación a través de CD40, BCR ó TLR9 simultáneamente la expresión de CD80, sin afectar la expresión de CD86, MHCII, ICAM-1 en la superficie de células LK-35.2**

*In vivo*, las CPA no son activadas por un solo estímulo a un tiempo dado, sino que cabe la posibilidad de que sean activadas por dos o más estímulos simultáneamente. En estas condiciones es muy probable que

la expresión de las moléculas en superficie se vea alterada como consecuencia de la interacción entre estímulos.

Para determinar la existencia de interacciones entre los diferentes estímulos que modifiquen el patrón de expresión de moléculas relacionadas con la respuesta inmune (CD80, CD86, CD40, MHCII, ICAMI y CD45), se estimularon linfocitos B con diferentes combinaciones:

- anti-CD40 + anti-IgG
- anti-CD40+ CpG-ODN
- anti-IgG + CpG-ODN
- anti-CD40 + anti-IgG + CpG-ODN

En la gráfica 5.4(c), se observa que al igual que en el experimento anterior, a lo largo del periodo de estimulación, la expresión de CD45 se comporta aleatoriamente independientemente del estímulo utilizado. CD45 no modifica su expresión en linfocitos B activados por lo que estos cambios son atribuibles al método y/o al sistema experimental utilizados.

En la gráfica 5.4(c) se observa también, que la magnitud de la respuesta inespecífica alcanza el 20 % en comparación con la expresión basal. La inespecificidad encontrada es mayor que al utilizar estímulos independientes, lo cual debe atribuirse al hecho de utilizar simultáneamente dos o tres estímulos.

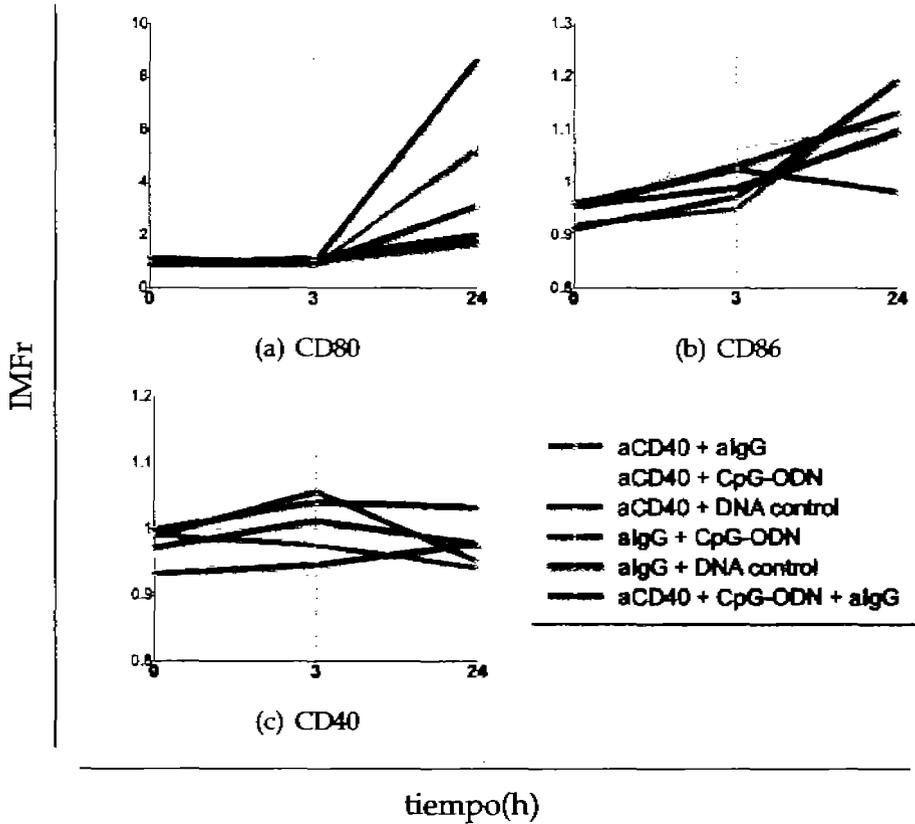
- Expresión de CD80.** En la figura 5.3(a) se observa un aumento muy evidente en la expresión de esta molécula en linfocitos activados. Después de tres horas de estimulación, la expresión de CD80 en todos los casos se mantuvo constante, pero después de 24 horas, el aumento en la expresión con todas las combinaciones de estímulos resulta considerable; aproximadamente el triple

cuando se utiliza la combinación anti-IgG + CpG-ODN, al utilizar las combinaciones anti-CD40 + anti-IgG ó anti-CD40+ CpG-ODN se obtiene una expresión cinco veces mayor que la basal, mientras que al utilizar los tres estímulos simultáneamente la expresión es ocho veces mayor que la expresión basal.

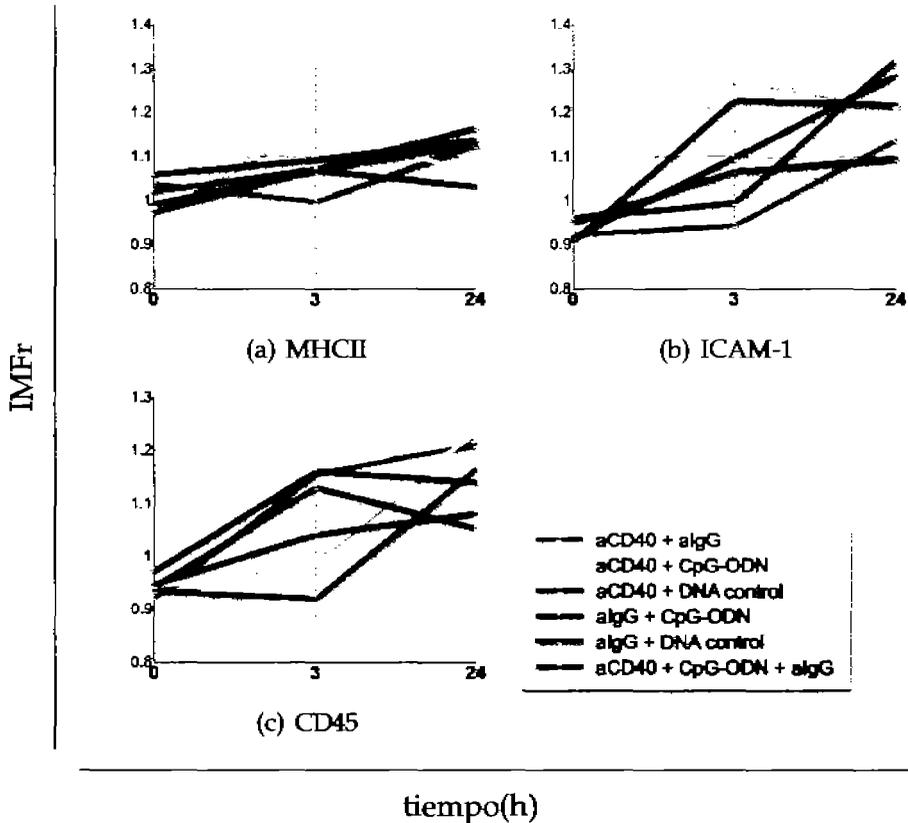
- **Expresión de CD86, CD40 y MHCII.** Como se observa en las figuras 5.3(b)(CD86), 5.3(c) (CD40) y 5.4(a)(MHCII), la estimulación de los linfocitos B bajo ninguna de las condiciones de activación utilizadas, modifica el patrón de expresión de estas tres moléculas.
- **Expresión de ICAM-I.** La expresión de ICAM-1, no se modifica con ninguno de los estímulos utilizados 5.4(b) durante las tres primeras horas, aunque después de 24 horas de estimulación hay un aumento al utilizar la combinación anti-IgG + CPG-ODN y la combinación anti-CD40 + anti-IgG + CpG-ODN. en ambos casos el cambio es aproximadamente 10 % con respecto a la expresión de ICAM-1 en células sin estimular.

El resultado más importante de este estudio es el cambio en la expresión de CD80. Como se observa en la figura 5.3 y como sucedió en el estudio anterior, la expresión de CD80 en la superficie aumenta con todos las combinaciones de estímulos utilizados, aunque la magnitud del cambio es mayor que cuando se estimula independientemente. El hecho de que la expresión de CD80 se modifique solo después de un periodo largo de estimulación, implica que esta molécula debe actuar tardíamente en el curso de la respuesta inmune.

En la misma gráfica se aprecia la existencia interacciones sinérgicas entre los diferentes estímulos, las cuales modifican significativamente la respuesta de los estímulos individuales. Este efecto se observa principalmente al utilizar combinaciones con anti-CD40, lo que indica la importancia de este mecanismo de coestimulación para los linfocitos B.



**Figura 5.3: Expresión de CD80, CD86 y CD40 en linfocitos bajo estímulos combinados.** Se incubaron  $1 \cdot 10^6$  células durante 3 y 24 horas en las siguientes soluciones: anti-CD40( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-IgG( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-Mac-1( $10\mu\text{g/ml}$ ), CPG-ODN( $0.1\mu\text{M}$ ) y DNA-control( $0.1\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: CD80-FITC(1:200), CD86-Alexa<sup>®</sup>(1:200), MHCII-biotina(1:100) e ICAM-1-biotina(1:200). En el caso de los anticuerpos biotinilados, las células se incubaron 15 minutos adicionales con soluciones de estreptavidina-PE(1:500) y estreptavidina-FITC(1:200). El resultado se expresa como Intensidad media de fluorescencia relativa(IMFr), de acuerdo a la fórmula siguiente:  $\text{IMFr} = \text{IMF cels. estimuladas} / \text{IMF cels. sin estimular}$ .



**Figura 5.4: Expresión de MHCII, ICAM-1 y CD45 en linfocitos bajo estímulos combinados.** Se incubaron  $1 \cdot 10^6$  células durante 3 y 24 horas en las siguientes soluciones: anti-CD40( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-IgG( $10\mu\text{g/ml}$ ), anti-Mac-1( $10\mu\text{g/ml}$ ), CPG-ODN( $0.1\mu\text{M}$ ) y DNA-control( $0.1\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: CD80-FITC(1:200), CD86-Alexa<sup>®</sup>(1:200), MHCII-biotina(1:100) e ICAM-1-biotina(1:200). En el caso de los anticuerpos biotinilados, las células se incubaron 15 minutos adicionales con soluciones de estreptavidina-PE(1:500) y estreptavidina-FITC(1:200). El resultado se expresa como Intensidad media de fluorescencia relativa(IMFr), de acuerdo a la fórmula siguiente:  $\text{IMFr} = \text{IMF cels. estimuladas} / \text{IMF cels. sin estimular}$ .

Al utilizar combinaciones de estímulos, se logra simular las condiciones que pueden encontrarse *in vivo*, por lo que los resultados, aunque resultan más difíciles de interpretar, describen con mayor precisión los eventos que suceden durante el curso de la respuesta inmune.

Para determinar el efecto biológico de cada uno de los estímulos, se simularon dos procesos importantes en el curso de la respuesta inmune. El primero, la endocitosis de antígeno, paso crucial en la generación de ligandos para las MHC en las CPA, y el segundo, y más importante, la presentación antigénica de estos epítopes a los linfocitos T específicos. En ambos ensayos y para simplificar el análisis de los resultados, solo se utilizaron estímulos independientes en la activación de la CPA.

### **5.3 La estimulación a través de BCR pero no de CD40 y TLR9 promueve la capacidad endocítica de las células LK35.2.**

Además de la modificación del perfil de expresión de moléculas de coestimulación y de adhesión en la superficie celular, existen otros mecanismos de regulación de la actividad de los linfocitos B en su papel de CPA.

Una de las funciones de los linfocitos B es la internalización de los antígenos a través del BCR para su posterior procesamiento y presentación a los linfocitos T. Se reporta en la literatura, que la señalización en los RAFTS lipídicos, específicamente la señalización mediada por el BCR, actúa como regulador de la internalización antigénica. Esto implica que tanto la señalización mediada por el BCR como la internalización del antígeno utilizan vías de señalización al interior de la célula en común, aunque estas aun no están bien definidas.<sup>83</sup>

El primer evento en el proceso de generación de ligandos del linfocito T es la internalización antigénica, la cual se lleva a cabo a través

de mecanismos inespecíficos como lo es la pinocitosis, o por endocitosis mediada por receptor.

La generación de péptidos específicos se lleva a cabo en vesículas a lo largo de la vía endocítica y depende en gran medida de la cantidad de antígeno endocitado. De ahí que los procesos endocíticos tengan gran influencia sobre la interacción entre las CPAs y los linfocitos T.

Para examinar si existe un aumento en la captura antigénica debido a la activación celular mediada por TLR9, CD40 y el propio BCR, se realizó un ensayo de endocitosis utilizando HEL marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en linfocitos B previamente estimulados durante 24 horas con soluciones de CpG-DNA, anti-CD40 (anticuerpo agonista) ó anti-IgG (entrecruzador del BCR).

El estudio se realizó por duplicado obteniendo resultados similares. Para simplificar el diseño experimental y el análisis de resultados en este estudio se utilizaron solo estímulos independientes. Como control irrelevante, se utilizaron linfocitos B estimulados con soluciones de anti-CD40, anti-IgG y CpG-ODN aunque estos no fueron cocultivados con la solución de HEL-FITC; este control es útil para determinar la respuesta inespecífica debida al sistema o métodos utilizados. Como control negativo, se utilizaron Linfocitos B no estimulados pero cocultivados en la solución de HEL-FITC.

A los resultados expresados como IMF, se les sustrajo el valor obtenido con el control irrelevante. En la gráfica 5.5 se observa que los linfocitos B que no reciben ningún estímulo, tienen una tasa de endocitosis basal elevada. Los linfocitos estimulados a través de CD40 y TLR9 por un periodo de 24 horas no modifican su tasa de endocitosis, mientras que los linfocitos B estimulados a través del BCR por un periodo de 24 horas, aumentan en un 30 % su tasa de endocitosis comparado con la tasa de endocitosis basal.

La tasa de endocitosis en los linfocitos estimulados a través de CD40 y TLR9 no se modifica durante el periodo de estimulación, y en los linfo-

citos B estimulados a través del BCR la tasa de endocitosis varía ligeramente, probablemente porque al utilizar HEL-FITC soluble, se promueve la internalización del antígeno a través de pinocitosis, el cual es un mecanismo totalmente inespecífico. Es probable que si se utilizaran linfocitos B con receptores de antígeno específicos para la HEL, la cantidad de antígeno endocitado sería mayor.

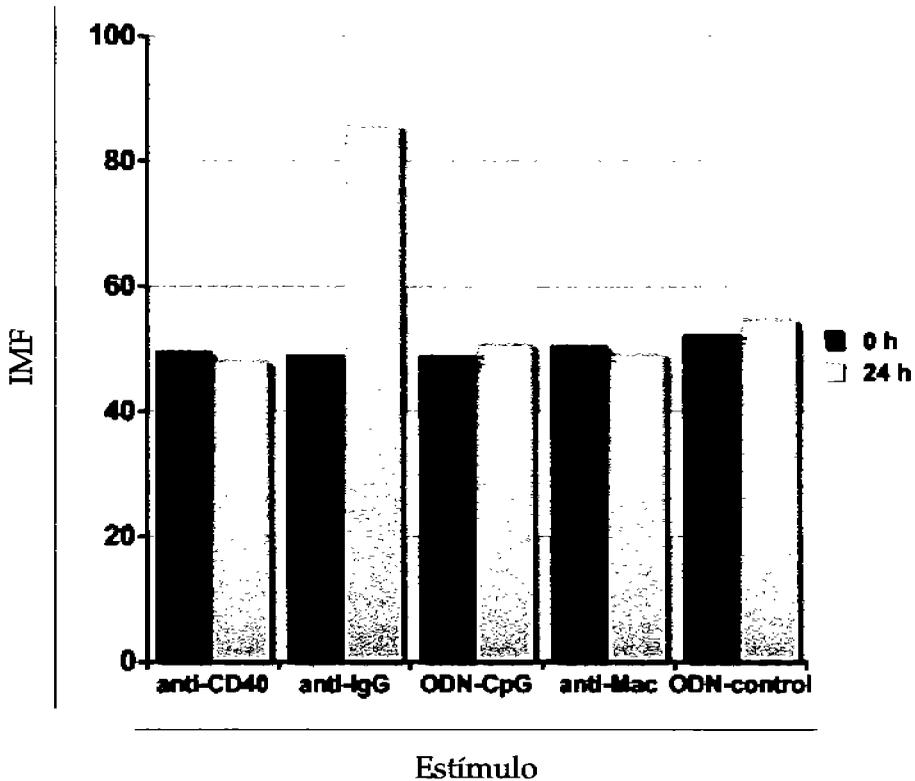
#### **5.4** La estimulación a través de CD40, pero no a través de otros receptores aumenta la eficiencia de las células LK-35.2 como CPA para activar linfocitos T.

El evento sobre el que repercuten muchos aspectos de la activación celular es precisamente la presentación antigénica. Para evaluar el efecto de la estimulación de las CPAs a través de CD40, BCR y TLR9 sobre este evento, se realizó un estudio de presentación antigénica utilizando al hibridoma LK35.2 como CPA y dos diferentes hibridomas de linfocitos T; el hibridoma A6B3, el cual reconoce el péptido 34-45 de la HEL unido a moléculas IA<sup>k</sup> y el hibridoma TS12, el cual reconoce el péptido 42-56 de RNAsa unido a moléculas IA<sup>k</sup>.

El estudio se realizó por duplicado obteniendo resultados similares en ambos experimentos. Se siguió el mismo protocolo de activación que en los estudios de expresión de moléculas de superficie; como control irrelevante se incluyeron linfocitos B sin estimular, como controles negativos se utilizaron los estímulos anti-Mac y un ODN sin motivos CpG.

Para facilitar la interpretación de los resultados, se decidió utilizar los péptidos específicos para cada hibridoma de T en lugar de utilizar el antígeno completo (HEL o RNAsa bovina), eliminando así los factores involucrados con el procesamiento antigénico.

Para ambos hibridomas, A6B3 y TS12, los estudios se realizaron utilizando tres diferentes concentraciones del péptido específico pero solo



**Figura 5.5:** Endocitosis de HEL-FITC por células LK35.2 bajo diferentes estímulos. La estimulación se realizó incubando  $2.5 \cdot 10^5$  células en soluciones de anti-CD40 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), anti-IgG ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) y CPG-ODN ( $0.1 \mu\text{M}$ ) durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavaron y se incubaron durante 3 h en  $100 \mu\text{l}$  de una solución de HEL-FITC ( $2 \text{ mg/ml}$ ) a  $37^\circ\text{C}$ .

se muestra la gráfica de la concentración que resultó óptima para cada uno de ellos.

Como se observa en la figura 5.6, la estimulación de los linfocitos B LK35.2 provoca una respuesta inespecífica de  $2 \cdot 10^3$  CPM mientras que la estimulación de los linfocitos B usando la solución de ODN control produce una respuesta inespecífica de  $1 \cdot 10^3$  CPM. La respuesta de ambos controles resulta de poca importancia al compararlo con la respuesta de las células estimuladas.

Los linfocitos B estimulados a través de CD40 aumentan su eficiencia en la presentación antigénica aproximadamente  $1 \cdot 10^5$  CPM cuando es comparada con las células sin estímulo. Las células estimuladas a través del BCR aumentan también su eficiencia de presentación en  $3 \cdot 10^4$  CPM mientras que la activación a través de TLR9 produce un aumento en la eficiencia de  $5 \cdot 10^4$  CPM.

Al utilizar el hibridoma TS12, como se observa en la figura 5.7, la respuesta del sistema es menor comparada contra la obtenida al utilizar el hibridoma A6B3, aunque el patrón de eficiencia de presentación, es similar con ambos hibridomas.

Los linfocitos B estimulados a través de CD40 aumentaron su eficiencia en aproximadamente  $3.8 \cdot 10^4$  CPM mientras que al estimular a través del BCR el  $\Delta$ CPM es de  $\simeq 3 \cdot 10^3$  CPM. Los linfocitos B activados a través de TLR9 aumentan su eficiencia en  $\simeq 6 \cdot 10^3$  CPM.

Analizando los resultados de este estudio, es muy claro que el estímulo que afecta en mayor medida la capacidad de presentación antigénica es CD40. Esta molécula coestimuladora contribuye significativamente en la activación de los linfocitos B, uno de sus mecanismos de acción es el aumento de la expresión de CD80 en la superficie celular.

La señalización a través de TLR9 también es importante para los linfocitos B en su función de CPA ya que además de favorecer la expresión de moléculas de coestimulación, hace más eficientes a estas células en la presentación de antígeno.

Por otro lado, la señalización mediada por el BCR promueve cambios importantes en la función de los linfocitos B, aumentando la capacidad endocítica y mejorando su capacidad de presentación de antígenos. Es interesante que a pesar de que la señalización a través del BCR aumenta la cantidad de endocitosis de antígenos, esto no se refleja en un aumento proporcional en la eficiencia de presentación, lo que sugiere que la presentación antigénica es regulada simultáneamente a través de varios mecanismos. Por lo que, para entender el papel de CD40, BCR y TLR9 sobre la presentación antigénica es necesario tomar en cuenta varios factores. El más importante es que la presentación antigénica es un proceso muy complejo y de gran importancia para las células, el cual se lleva a cabo en varias etapas, en cada una existen eventos cruciales los cuales, son regulados a través de muchas moléculas diferentes además de las estudiadas en el presente trabajo.

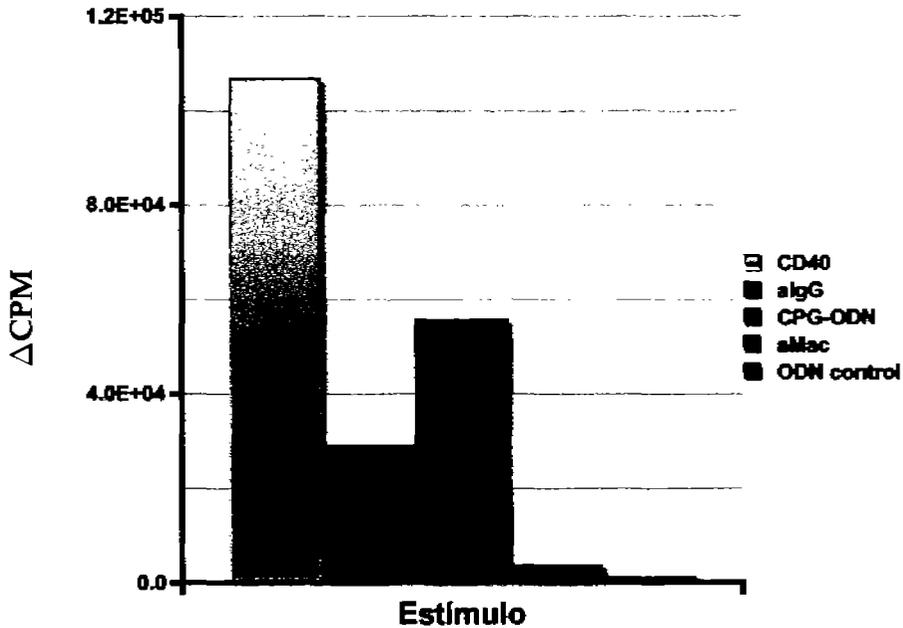
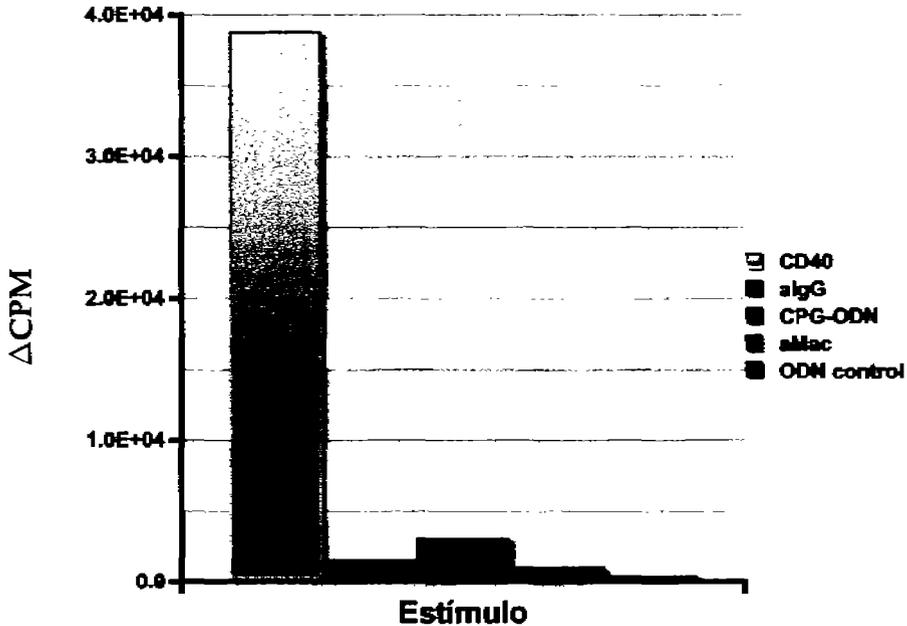


Figura 5.6: *Presentación antigénica del péptido de 34-45 de HEL por linfocitos LK35.2 estimulados a través de CD40, BCR y TLR9. Se utilizó como CPA al hibridoma LK35.2 y al hibridoma de T, A6B3. El ensayo se realizó a tres diferentes concentraciones de péptido; la gráfica representa la concentración de péptido en la que se obtuvo la mejor respuesta.*



**Figura 5.7:** Estudio de presentación del péptido 42-56 de RNAsa bovina por linfocitos B LK35.2 estimulados a través de CD40, BCR y TLR9. Se utilizó como CPA, el hibridoma de T, TS12, el cual reconoce el fragmento 42-56 de RNAsa bovina y como CPA, el hibridoma de B, LK35.2. El estudio se realizó a tres diferentes concentraciones de péptido; la gráfica representa la concentración de péptido en la que se obtuvo la mejor respuesta.

## CAPÍTULO SEIS

---

### Conclusiones

---

El modelo utilizado en el presente trabajo permitió evaluar y comparar el efecto de la señalización a través de CD40, BCR y TLR9 en la activación de una línea celular de linfocitos B.

Los resultados indican que de los estímulos estudiados, CD40 es el más eficiente en el proceso de activación de los linfocitos B. La señalización mediada por CD40 favorece la presentación antigénica, a través del aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras, principalmente CD80 en la superficie celular.

La señalización mediada por el BCR es importante en la activación de linfocitos B, promoviendo la expresión de la molécula de coestimulación CD80, además de aumentar la capacidad endocítica de la CPA y la presentación de antígeno.

El efecto de la señalización a través de TLR9 sobre la activación de linfocitos B se lleva a cabo a través del aumento en la expresión de la molécula coestimuladora CD80.

---

## Referencias

---

- [1] Aber K.M., Nori P., MacDonald S.M., Bibat G., Jarrar M.H., and Kaufmann W.E. Methyl-CpG-Binding Protein 2 Is Localized in the Postsynaptic Compartment: an Immunochemical Study of Subcellular Fractions. *Neuroscience*, 2003. 116: 77–80.
- [2] Moreno C. and Sanchez-Ibarrola A. Toll Type Receptors: Molecular Bases of the Relationship Between Innate and Adaptation Responses of the Immune System. *Rev.Med.Univ Navarra*, 2003. 47: 29–33.
- [3] Van Den Berg T.K., Yoder J.A., and Litman G.W. On the Origins of Adaptive Immunity: Innate Immune Receptors Join the Tale. *Trends Immunol.*, 2004. 25: 11–16.
- [4] Lumsden J.M., Williams J.A., and Hodes R.J. Differential Requirements for Expression of CD80/86 and CD40 on B Cells for T-Dependent Antibody Responses in Vivo. *J Immunol*, 2003. 170: 781–7.
- [5] Lehner P.J. and Cresswell P. Recent Developments in MHC-Class-I-Mediated Antigen Presentation. *Curr.Opin.Immunol.*, 2004. 16: 82–89.

- [6] Bryant P. and Ploegh H. Class II MHC Peptide Loading by the Professionals. *Curr.Opin.Immunol.*, 2004. 16: 96-102.
- [7] Riese R.J., Mitchell R.N., Villadangos J.A., Shi G.P., Palmer J.T., Karp E.R., De Sanctis G.T., Ploegh H.L., and Chapman H.A. Cathepsin S Activity Regulates Antigen Presentation and Immunity. *J Clin Invest*, 1998. 101(11): 2351-63.
- [8] Bania J., Gatti E., Lelouard H., David A., Cappello F., Weber E., Camosseto V., and Pierre P. Human Cathepsin S, but Not Cathepsin L, Degrades Efficiently MHC Class II-Associated Invariant Chain in Nonprofessional APCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(11): 6664-9.
- [9] Brocke P., Garbi N., Momburg F., and Hammerling G.J. HLA-DM, HLA-DO and Tapasin: Functional Similarities and Differences. *Curr.Opin.Immunol.*, 2002. 14: 22-29.
- [10] Wang S. and Chen L. Co-Signaling Molecules of the B7-CD28 Family in Positive and Negative Regulation of T Lymphocyte Responses. *Microbes.Infect.*, 2004. 6: 759-766.
- [11] Reth M. and Wienands J. Initiation and Processing of Signals from the B Cell Antigen Receptor. *Annu.Rev.Immunol.*, 1997. 15: 453-479.
- [12] Kurosaki T. Genetic Analysis of B Cell Antigen Receptor Signaling. *Annu.Rev.Immunol.*, 1999. 17: 555-592.
- [13] Hombach J., Leclercq L., Radbruch A., Rajewsky K., and Reth M. A Novel 34-Kd Protein Co-Isolated with the IgM Molecule in Surface IgM-Expressing Cells. *EMBO J.*, 1988. 7: 3451-3456.
- [14] Sakaguchi N., Kashiwamura S., Kimoto M., Thalmann P., and Melchers F. B Lymphocyte Lineage-Restricted Expression of Mb-1, a

- Gene with CD3-Like Structural Properties. *EMBO J.*, 1988. 7: 3457–3464.
- [15] Campbell K.S., Hager E.J., Friedrich R.J., and Cambier J.C. IgM Antigen Receptor Complex Contains Phosphoprotein Products of B29 and Mb-1 Genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1991. 88: 3982–3986.
- [16] Reth M. Antigen Receptor Tail Clue. *Nature*, 1989. 338: 383–384.
- [17] Dal Porto J.M., Gauld S.B., Merrell K.T., Mills D., Pugh-Bernard A.E., and Cambier J. B Cell Antigen Receptor Signaling 101. *Mol.Immunol.*, 2004. 41: 599–613.
- [18] Cheng P.C., Brown B.K., Song W., and Pierce S.K. Translocation of the B Cell Antigen Receptor into Lipid Rafts Reveals a Novel Step in Signaling. *J.Immunol.*, 2001. 166: 3693–3701.
- [19] Simons K. and Ikonen E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature*, 1997. 387: 569–572.
- [20] Cheng P.C., Dykstra M.L., Mitchell R.N., and Pierce S.K. A Role for Lipid Rafts in B Cell Antigen Receptor Signaling and Antigen Targeting. *J.Exp.Med.*, 1999. 190: 1549–1560.
- [21] Hata A., Sabe H., Kurosaki T., Takata M., and Hanafusa H. Functional Analysis of Csk in Signal Transduction Through the B-Cell Antigen Receptor. *Mol.Cell Biol.*, 1994. 14: 7306–7313.
- [22] Pao L.I. and Cambier J.C. Syk, but Not Lyn, Recruitment to B Cell Antigen Receptor and Activation Following Stimulation of. *J.Immunol.*, 1997. 158: 2663–2669.
- [23] Katagiri T., Ogimoto M., Hasegawa K., Mizuno K., and Yakura H. Selective Regulation of Lyn Tyrosine Kinase by CD45 in Immature B Cells. *J.Biol.Chem.*, 1995. 270: 27987–27990.

- [24] Turner M., Schweighoffer E., Colucci F., Di Santo J.P., and Tybulewicz V.L. Tyrosine Kinase SYK: Essential Functions for Immune-receptor Signalling. *Immunol.Today*, 2000. 21: 148–154.
- [25] Kurosaki T., Johnson S.A., Pao L., Sada K., Yamamura H., and Cambier J.C. Role of the Syk Autophosphorylation Site and SH2 Domains in B Cell Antigen Receptor Signaling. *J.Exp.Med.*, 1995. 182: 1815–1823.
- [26] Richards J.D., Gold M.R., Hourihane S.L., DeFranco A.L., and Matsuchi L. Reconstitution of B Cell Antigen Receptor-Induced Signaling Events in a Nonlymphoid Cell Line by Expressing the Syk Protein-Tyrosine Kinase. *J.Biol.Chem.*, 1996. 271: 6458–6466.
- [27] Fu C., Turck C.W., Kurosaki T., and Chan A.C. BLNK: a Central Linker Protein in B Cell Activation. *Immunity*, 1998. 9: 93–103.
- [28] Janssen E. and Zhang W. Adaptor Proteins in Lymphocyte Activation. *Curr.Opin.Immunol.*, 2003. 15: 269–276.
- [29] Cannons J.L. and Schwartzberg P.L. Fine-Tuning Lymphocyte Regulation: What's New with Tyrosine Kinases and Phosphatases? *Curr.Opin.Immunol.*, 2004. 16: 296–303.
- [30] Campbell M.A. and Sefton B.M. Association Between B-Lymphocyte Membrane Immunoglobulin and Multiple Members of the Src Family of Protein Tyrosine Kinases. *Mol.Cell Biol.*, 1992. 12: 2315–2321.
- [31] Wagle N.M., Faassen A.E., Kim J.H., and Pierce S.K. Regulation of B Cell Receptor-Mediated MHC Class II Antigen Processing by FcγRIIB1. *J.Immunol.*, 1999. 162: 2732–2740.

- [32] Batista F.D., Iber D., and Neuberger M.S. B Cells Acquire Antigen from Target Cells After Synapse Formation. *Nature*, 2001. 411: 489–494.
- [33] Stoddart A., Dykstra M.L., Brown B.K., Song W., Pierce S.K., and Brodsky F.M. Lipid Rafts Unite Signaling Cascades with Clathrin to Regulate BCR Internalization. *Immunity*, 2002. 17: 451–462.
- [34] Noelle R.J. CD40 and Its Ligand in Host Defense. *Immunity*, 1996. 4: 415–9.
- [35] Durandy A. and Honjo T. Human Genetic Defects in Class-Switch Recombination (hyper-IgM Syndromes). *Curr.Opin.Immunol.*, 2001. 13: 543–548.
- [36] Ferrari S., Giliani S., Insalaco A., Al-Ghonaium A., Soresina A.R., Loubser M., Avanzini M.A., Marconi M., Badolato R., Ugazio A.G., Levy Y., Catalan N., Durandy A., Tbakhi A., Notarangelo L.D., and Plebani A. Mutations of CD40 Gene Cause an Autosomal Recessive Form of Immunodeficiency with Hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98: 12614–9.
- [37] Marsters S.A., Frutkin A.D., Simpson N.J., Fendly B.M., and Ashkenazi A. Identification of Cysteine-Rich Domains of the Type 1 Tumor Necrosis Factor Receptor Involved in Ligand Binding. *J Biol Chem*, 1992. 267: 5747–50.
- [38] Tone M., Tone Y., Fairchild P.J., Wykes M., and Waldmann H. Regulation of CD40 Function by Its Isoforms Generated Through Alternative Splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98: 1751–6.
- [39] Ni C.Z., Welsh K., Leo E., Chiou C.K., Wu H., Reed J.C., and Ely K.R. Molecular Basis for CD40 Signaling Mediated by TRAF3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2000. 97: 10395–10399.

- [40] Kuiper H.M., Brouwer M., Linsley P.S., and Van Lier R.A. Activated T Cells Can Induce High Levels of CTLA-4 Expression on B Cells. *J Immunol*, 1995. 155: 1776-83.
- [41] Hsu Y.M., Lucci J., Su L., Ehrenfels B., Garber E., and Thomas D. Heteromultimeric Complexes of CD40 Ligand Are Present on the Cell Surface of Human T Lymphocytes. *J.Biol.Chem.*, 1997. 272: 911-915.
- [42] Graf D., Muller S., Korthauer U., Van K.C., Weise C., and Kroczeck R.A. A Soluble Form of TRAP (CD40 Ligand) Is Rapidly Released After T Cell Activation. *Eur.J.Immunol.*, 1995. 25: 1749-1754.
- [43] Pietravalle F., Lecoanet-Henchoz S., Blasey H., Aubry J.P., Elson G., Edgerton M.D., Bonnefoy J.Y., and Gauchat J.F. Human Native Soluble CD40L Is a Biologically Active Trimer, Processed Inside Microsomes. *J.Biol.Chem.*, 1996. 271: 5965-5967.
- [44] Karpusas M., Hsu Y.M., Wang J.H., Thompson J., Lederman S., Chess L., and Thomas D. 2 A Crystal Structure of an Extracellular Fragment of Human CD40 Ligand. *Structure.*, 1995. 3: 1031-1039.
- [45] Van Kooten C. and Banchereau J. Functions of CD40 on B Cells, Dendritic Cells and Other Cells. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9: 330-7.
- [46] Van Kooten C. Immune Regulation by CD40-CD40-L Interactions - 2; Y2K Update. *Front Biosci*, 2000. 5: 880-693.
- [47] Sarma V., Lin Z., Clark L., Rust B.M., Tewari M., Noelle R.J., and Dixit V.M. Activation of the B-Cell Surface Receptor CD40 Induces A20, a Novel Zinc Finger Protein That Inhibits Apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 1995. 270: 12343-12346.

- [48] Lee H.H., Dempsey P.W., Parks T.P., Zhu X., Baltimore D., and Cheng G. 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*, 1999. 96: 1421-1426.
- [49] Clatza A., Bonifaz L.C., Vignali D.A., and Moreno J. CD40-Induced Aggregation of MHC Class II and CD80 on the Cell Surface Leads to an Early Enhancement in Antigen Presentation. *J Immunol*, 2003. 171: 6478-87.
- [50] Vidalain P.O., Azocar O., Servet-Delprat C., Rabourdin-Combe C., Gerlier D., and Manie S. CD40 Signaling in Human Dendritic Cells Is Initiated Within Membrane Rafts. *Embo J*, 2000. 19: 3304-13.
- [51] Loh Y.T. and Martin G.B. Pto Bacterial Resistance Gene and the Fen Insecticide Sensitivity Gene Encode Functional Protein Kinases with Serine/threonine Specificity, The. *Plant Physiol*, 1995. 108: 1735-9.
- [52] Martin M.U. and Wesche H. Summary and Comparison of the Signaling Mechanisms of the Toll/interleukin-1 Receptor Family. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1592: 265-80.
- [53] Anderson K.V., Jurgens G., and Nusslein-Volhard C. Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: Genetic Studies on the Role of the Toll Gene Product. *Cell*, 1985. 42: 779-89.
- [54] Hashimoto C., Hudson K.L., and Anderson K.V. Toll Gene of Drosophila, Required for Dorsal-Ventral Embryonic Polarity, Appears to Encode a Transmembrane Protein, The. *Cell*, 1988. 52: 269-79.
- [55] Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., and Hoffmann J.A. Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spatzle/Toll/cactus

- Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults, *The. Cell*, 1996. 86: 973–83.
- [56] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., and A. Jr. J.C. A Human Homologue of the *Drosophila* Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature*, 1997. 388: 394–7.
- [57] Aderem A. and Ulevitch R.J. Toll-Like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response. *Nature*, 2000. 406: 782–7.
- [58] Akira S. and Hemmi H. Recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns by TLR Family. *Immunol Lett*, 2003. 85: 85–95.
- [59] Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., and Bazan J.F. A Family of Human Receptors Structurally Related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95: 588–93.
- [60] Suzuki N., Suzuki S., and Yeh W.C. IRAK-4 as the Central TIR Signaling Mediator in Innate Immunity. *Trends Immunol*, 2002. 23: 503–6.
- [61] O'Neill L. Toll/interleukin-1 Receptor Domain: a Molecular Switch for Inflammation and Host Defence, *The. Biochem Soc Trans*, 2000. 28: 557–63.
- [62] Imler J.L. and Hoffmann J.A. Toll Receptors in *Drosophila*: a Family of Molecules Regulating Development and Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. 270: 63–79.
- [63] Gay N.J. and Keith F.J. *Drosophila* Toll and IL-1 Receptor. *Nature*, 1991. 351: 355–6.
- [64] Kandimalla E.R., Zhu F.G., Bhagat L., Yu D., and Agrawal S. Toll-Like Receptor 9: Modulation of Recognition and Cytokine Induction by Novel Synthetic CpG DNAs. *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(Pt 3): 654–8.

- [65] Liu L., Zhou X., Shi J., Xie X., and Yuan Z. Toll-Like Receptor-9 Induced by Physical Trauma Mediates Release of Cytokines Following Exposure to CpG Motif in Mouse Skin. *Immunology*, 2003. 110: 341-7.
- [66] Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger Direct B-Cell Activation. *Nature*, 1995. 374: 546-9.
- [67] Messina J.P., Gilkeson G.S., and Pisetsky D.S. Stimulation of in Vitro Murine Lymphocyte Proliferation by Bacterial DNA. *J Immunol*, 1991. 147: 1759-64.
- [68] Stacey K.J., Sweet M.J., and Hume D.A. Macrophages Ingest and Are Activated by Bacterial DNA. *J.Immunol.*, 1996. 157: 2116-2122.
- [69] Jakob T., Walker P.S., Krieg A.M., Udey M.C., and Vogel J.C. Activation of Cutaneous Dendritic Cells by CpG-Containing Oligodeoxynucleotides: a Role for Dendritic Cells in the Augmentation of Th1 Responses by Immunostimulatory DNA. *J Immunol*, 1998. 161: 3042-9.
- [70] Iho S., Yamamoto T., Takahashi T., and Yamamoto S. Oligodeoxynucleotides Containing Palindrome Sequences with Internal 5'-CpG-3' Act Directly on Human NK and Activated T Cells to Induce IFN-Gamma Production in Vitro. *J Immunol*, 1999. 163: 3642-52.
- [71] Zhao Q., Yu D., and Agrawal S. Immunostimulatory Activity of CpG Containing Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide Is Modulated by Modification of a Single Deoxynucleoside. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000. 10: 1051-4.
- [72] Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., and Akira S. A

- Toll-Like Receptor Recognizes Bacterial DNA. *Nature*, 2000. 408: 740-5.
- [73] Hartmann G., Weiner G.J., and Krieg A.M. CpG DNA: a Potent Signal for Growth, Activation, and Maturation of Human Dendritic Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96: 9305-10.
- [74] Lorenz R.G., Tyler A.N., and 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.*, 1988. 141: 4124-4128.
- [75] Barois N., Forquet F., and Davoust J. Selective Modulation of the Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation Pathway Following B Cell Receptor Ligation and Protein Kinase C Activation. *J.Biol.Chem.*, 1997. 272: 3641-3647.
- [76] Qi L. and Ostrand-Rosenberg S. MHC Class II Presentation of Endogenous Tumor Antigen by Cellular Vaccines Depends on the Endocytic Pathway but Not H2-M. *Traffic.*, 2000. 1: 152-160.
- [77] Bonifaz L.C., Arzate S., and 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.*, 1999. 29: 119-131.
- [78] Salomoni P., Perrotti D., Martinez R., Franceschi C., and Calabretta B. Resistance to Apoptosis in CTLL-2 Cells Constitutively Expressing C-Myb Is Associated with Induction of BCL-2 Expression and Myb-Dependent Regulation of Bcl-2 Promoter Activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1997. 94: 3296-3301.
- [79] Gramzinski R.A., Doolan D.L., Sedegah M., Davis H.L., Krieg A.M., and Hoffman S.L. Interleukin-12- and Gamma Interferon-Dependent Protection Against Malaria Conferred by CpG Oligodeoxynucleotide in Mice. *Infect Immun*, 2001. 69: 1643-9.

- [80] Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J., Walravens K., and Letesson J.J. Protection of BALB/c Mice Against *Brucella Abortus* 544 Challenge by Vaccination with Bacterioferritin or P39 Recombinant Proteins with CpG Oligodeoxynucleotides as Adjuvant. *Infect Immun*, 2001. 69: 4816-22.
- [81] Coligan E.B.J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W., and Coligan J.E. *Current Protocols in Immunology on CD-ROM*, cd-rom edition.
- [82] Clatza A. Efecto de La Interaccion CD40-CD40L En La Presentacion de Antígenos Endógenos Y Exógenos Por Moléculas Clase II Del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Master's thesis, Universidad Nacional Autonoma de México, 1998. Licenciatura.
- [83] McGovern E.M., Moquin A.E., Caballero A., and Drake J.R. Effect of B Cell Receptor Signaling on Antigen Endocytosis and Processing, *The Immunol.Invest*, 2004. 33: 143-156.