



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**PAPEL DE CD5 EN LA REGULACIÓN DE LA
RESPUESTA INMUNE**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ERICA PAULINA BURGUEÑO BUCIO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:
DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA, CENTRO
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

DR. VIANNEY FRANCISO ORTIZ NAVARRETE
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR,
CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO, Septiembre 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi padres, porque a ellos les debo todo. Gracias por siempre tomarme de la mano, para guiarme y sostenerme. Por siempre impulsarme a ser una mejor persona, retarme y enseñarme a disfrutar la vida. Los amo infinitamente.

A mi hermano, porque no se que sería de mi vida sin ti. Gracias por ser mi roca y hacer mi vida mucho mejor y más feliz. Te amo enano

A Clau, por siempre estar, por compartir las cosas buenas y malas de la vida, porque como dijimos un monton de veces, la vida se nos tiene que poner bonita, y se nos esta poniendo bonita. Siempre estaremos ahí. Te amo

A toda mi familia, por ser la mejor del mundo. Por todas las risas, las loculas y el cariño. Por estar siempre presentes.

A mis amigos, por seguir compartiendo este camino que se llama vida. Especialmente a Marisa, Lau y Tania. Les debo muchísimo, gracias por estar en los momentos mas difíciles y no dejarme caer. A las niñas del CINVES por toda una vida juntas acompañándonos y creciendo.

A ti, porque a pesar de que ya no estas, fuiste parte importante de este camino. Gracias por lo bueno y lo malo, por que cada experiencia me marcó y me ayudó a ser la persona que soy ahora.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Soldevila, por abrirme las puertas de su laboratorio, por permitirme aprender, crecer, caerme y levantarme. Por todas las enseñanzas y las oportunidades brindadas, porque un laboratorio es tan grande como la persona que lo dirige.

Al Dr. Eduardo Zepeda[†] por siempre estar dispuesto a dar una crítica constructiva, por su eterna disposición con los alumnos para ayudarlos a crecer y formarse en el camino de la ciencia. Siempre será recordado con mucho cariño y admiración.

A mi comité tutor, la Dra. Laura Bonifaz y el Dr. Vianney Ortiz. Por toda la ayuda brindada a lo largo de este proceso, por todos los buenos consejos y la guía. Infinitas gracias.

Al M. en C. Oscar Hernández Campos, por toda el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.

Al QFB. Carlos Castellanos Barba y al M. en C. Erick Espindola Arriaga, por las largas horas de sorting, sin su ayuda y su tiempo esta tesis no hubiera sido posible.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, porque una gran parte de mi tiempo lo pase entre esos equipos, sin ellos esta tesis no tendría sentido

Esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo con el apoyo de CONACyT Proyecto #166024 y #253274. Erica Paulina Burgueño Bucio recibió durante la realización de su doctorado una beca de CONACyT #513171

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	1
2	RESUMEN	3
3	ABSTRACT	5
4	INTRODUCCIÓN	7
4.1	CÉLULAS DENDRÍTICAS	7
4.1.1	<i>Subpoblaciones de DC</i>	7
4.1.2	<i>Función de las DC</i>	9
4.2	CÉLULAS T REGULADORAS	12
4.2.1	<i>Tregs tímicas (tTregs)</i>	15
4.2.2	<i>Tregs periféricas (pTregs)</i>	17
4.3	CD5	19
4.3.1	<i>Generalidades</i>	19
4.3.1.1	<i>Ligandos de CD5</i>	20
4.3.1.2	<i>Dominios de señalización de CD5</i>	22
4.3.2	<i>Papel de CD5 en la modulación de las señales del TCR</i>	22
4.3.2.1	<i>CD5 como un regulador positivo de las señales del TCR</i>	22
4.3.2.2	<i>CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR</i>	24
4.3.3	<i>CD5 como un regulador de la supervivencia celular</i>	25
4.3.4	<i>CD5 como un regulador de las respuestas inmunes</i>	29
4.3.4.1	<i>Papel de CD5 en la tolerancia central</i>	30
4.3.4.2	<i>Papel de CD5 en la generación de anergia</i>	32
4.3.4.3	<i>CD5 como regulador de diferenciación de células T CD4+</i>	34
4.3.4.4	<i>Papel de CD5 en la regulación de la respuesta inmune</i>	36
4.3.4.5	<i>Papel regulador de CD5 en linfocitos B</i>	36
5	ANTECEDENTES	37
5.1	CD5 EN OTRAS POBLACIONES INMUNES	37
5.2	PAPEL DE CD5 EN LA GENERACIÓN DE TREGS	39
6	JUSTIFICACIÓN	42
7	HIPÓTESIS	43
8	OBJETIVOS	43
8.1	GENERAL	43
8.2	PARTICULARES	43
9	MATERIALES Y METODOS	44
9.1	RATONES	44
9.2	TIPAJE DE RATONES	45
9.3	OBTENCIÓN DE CÉLULAS	46
9.3.1	<i>Análisis de células T reguladoras</i>	46
9.3.2	<i>Análisis de DC</i>	46
9.3.3	<i>Obtención de células CD11c+</i>	47
9.3.4	<i>Obtención de DC a partir de médula ósea</i>	47
9.4	MADURACIÓN DE DC	48
9.5	ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	48
9.6	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR LAS DC	50
9.6.1	<i>ELISA</i>	50
9.6.2	<i>PCR en tiempo real</i>	50

9.7	ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T POR DC	51
9.7.1	<i>Proliferación de células T</i>	51
9.7.1.1	Análisis de la proliferación in vitro	51
9.7.1.2	Análisis de la proliferación in vivo	52
9.7.2	<i>Producción de citocinas por las células T</i>	52
9.7.2.1	Análisis de la producción de citocinas in vitro	52
9.7.2.2	Análisis de la producción de citocinas in vivo.....	53
9.8	INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL	53
9.9	RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD POR CONTACTO	54
9.10	INDUCCIÓN DE CÉLULAS TREGS	54
9.10.1	<i>Inducción mediada por DC</i>	54
9.10.2	<i>Inducción mediada por anticuerpos</i>	55
9.11	ENSAYO DE SUPRESIÓN	55
9.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
10	RESULTADOS	57
10.1	LA EXPRESIÓN DE CD5 EN DC Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES	57
10.1.1	<i>Las DC en órganos linfoides y no linfoides expresan CD5</i>	57
10.1.2	<i>Papel de CD5 en el desarrollo de DC</i>	59
10.1.3	<i>Papel de CD5 en la función de DC</i>	61
10.1.4	<i>CD5 modula la capacidad de las DC de estimular células T y de inducir respuestas inmunes.</i> <i>64</i>	
10.1.5	<i>CD5 modula la respuesta antitumoral</i>	68
10.1.6	<i>CD5 regula respuestas de tipo hipersensibilidad por contacto</i>	70
10.1.7	<i>La re-expresión de CD5 en DC CD5^{-/-} restablece su capacidad normal de activar las células</i> . <i>71</i>	
10.1.8	<i>Papel de las DC CD5^{-/-} en la generación de Tregs</i>	74
10.2	PAPEL DEL DOMINIO DE UNIÓN DE CK2 A CD5 EN LA GENERACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS	77
10.2.1	<i>Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la generación de Tregs en homeostasis</i>	77
10.2.2	<i>Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la función de las células Treg</i>	81
10.2.3	<i>Papel de dominio de unión de CK2 a CD5 en la inducción de Tregs</i>	82
10.3	RESUMEN DE LOS RESULTADOS	85
11	DISCUSIÓN	86
11.1	LA EXPRESIÓN DE CD5 EN DC Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES	86
11.2	PAPEL DEL DOMINIO DE UNIÓN DE CK2 A CD5 EN LA GENERACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS	97
12	CONCLUSIONES	105
13	PERSPECTIVAS	107
14	REFERENCIAS	108
15	PUBLICACIONES	117

1 ABREVIATURAS

AICD Muerte inducida por activación

CD Clúster de diferenciación

CD5^{-/-} Deficiente de CD5

CD5-CK2BD Dominio de unión de CK2 a CD5

CD5 Δ CK2 Deficiente del dominio de unión de CK2 a CD5

cDC DC convencional

CK2 Casein cinasa 2

CTLA-4 Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

DAG Diacil glicerol

DC Células Dendríticas

DNA Acido desoxirribonucleico

DNBS ácido dinitrobenzenosulfónico

DP Doble Positivo

EAE Encefalitis autoinmune experimental

GFP Proteína verde fluorescente

GITR Gen relacionado con la familia TNFR inducida por glucocorticoides

ICOS Co-estimulador inducible de Células T

Ig Inmunoglobulina

IL Interleucina

INF Interferon

IRF Factor de regulación de interferon

ITAM Motivo inmunoreceptor de activación basado en tirosina

iTreg Treg inducida

MHC Complejo principal de histocompatibilidad

MOG Glicoproteína de mielina del oligodendrocito

PC-PLC Fosfolipasa C Fosfatidilcolina-específica

PD-1 Molécula de muerte programada 1

pDC DC plasmacitoide
PD-L Ligando de PD
PI3K Fosfoinositol 3-cinasa
PMA Acetato de miristato de forbol
pTreg Treg periférica
SFB Suero Fetal Bovino
SP Simple Positivo
SRCR Receptor carroñero rico en cisteínas
TCR Receptor de células T
TGF Factor de crecimiento tumoral
Th Célula T cooperadora
TLR Receptor tipo Toll
TNF Factor de necrosis tumoral
Treg Célula T reguladora
tTreg Treg tímica
WT Silvestre (Wild Type)

2 RESUMEN

CD5 es regulador de las señales de TCR, que desempeña un papel en el desarrollo, activación, supervivencia y diferenciación de las células T. Sin embargo, su expresión y relevancia funcional en otras líneas celulares no ha sido estudiado. En este trabajo se demostró que CD5 se expresa en DC CD11c⁺ de timo, ganglios linfáticos, bazo, piel y pulmón. La ausencia de CD5 no afecta el desarrollo DC en homeostasis. Sin embargo, las DC deficientes de CD5 producen niveles significativamente más altos de IL-12 que las DC silvestres en respuesta a LPS e inducen una mayor proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺, así como un aumento significativo de la producción de IL-2 e INF γ por parte de las células T. En consecuencia, las DC CD5^{-/-} generan respuestas antitumorales y de hipersensibilidad por contacto significativamente más potentes que las DC WT. La re-expresión de CD5 en DC CD5^{-/-} restablece la producción de IL-12 y la capacidad para estimular células T a niveles similares a los de DC WT. Asimismo, las DC CD5^{-/-} presentan una menor capacidad de inducción hacia células T reguladoras, las cuales presentan una menor expresión de Foxp3. En conjunto, nuestros resultados mostraron que la expresión de CD5 en DC regula la producción de IL-12 y la capacidad de estimular las células T para inducir respuestas inmunes, revelando un nuevo papel de CD5 en la regulación de la biología de DC.

Se ha reportado que las células T reguladoras expresan altos niveles de CD5 y que la deficiencia de CD5 induce una mayor generación de Tregs en el timo y favorece

la supervivencia de éstas. Adicionalmente, se ha descrito que las células T CD4 + con baja o nula expresión de CD5 son menos susceptibles convertirse en Treg. Sin embargo, los mecanismos moleculares y los dominios de CD5 involucrados no han sido estudiados. Este trabajo muestra que el dominio de unión de CK2 a CD5 no está involucrado en la generación de Treg en homeostasis y no afecta su capacidad supresora. De manera interesante, las células T CD4+ deficientes en el dominio de unión de CK2 a CD5 presentan una mayor susceptibilidad para convertirse en Treg y expresan niveles significativamente mayores de Foxp3. Nuestros resultados demuestran que el dominio de unión de CK2 a CD5 no está involucrado en la generación de células T reguladoras tímicas, pero si en la inducción *de novo* de células T reguladoras periféricas. La discrepancia de los resultados obtenidos a partir de los ratones deficientes de CD5 y del dominio de unión de CK2 a CD5 sugieren que otros dominios de la cola citoplasmica de CD5 podrian estar involucrados en la generación y función de las Tregs.

3 ABSTRACT

CD5 is a well-known regulator of TCR signaling that has been shown to have a role in T cell development, activation, survival and differentiation. However, the molecular mechanism by which CD5 exerts its functions is not fully understood. The expression of CD5 in T cells has been studied for over 30 years, but it was not until recently that the expression of this receptor was reported on different subsets of human dendritic cells (DC). Here we show that CD5 is expressed in lymphoid (thymus, lymph node and spleen) and non-lymphoid (skin and lung) CD11c⁺ DC. CD5 does not have a role in the development of DC; however, CD5-deficient (CD5^{-/-}) DC produced significantly higher levels of IL-12 than wild type DC in response to LPS. CD5^{-/-} DC also induce enhanced proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and increased IL-2 and INF- γ production by T cells than WT DC. Accordingly, CD5^{-/-} DC generated a more potent anti-tumor and contact hypersensitivity responses compared to those generated by WT DC. Re-expression of CD5 in CD5^{-/-} DC restored IL-12 production and their capacity to stimulate T cells similar to WT. In line with this, CD5^{-/-} DC have a reduce capacity to induce CD4⁺ T cells differentiation towards Tregs and reduced Foxp3 expression. Altogether, these results show that CD5 expression on DC regulates IL-12 production and the ability to stimulate T cells and induce immune responses, revealing a new role for CD5 in the regulation of DC biology.

CD5 is overexpressed in regulatory T cells. It has been reported that CD5 deficiency leads to increased generation and survival of thymic Tregs. Also, it has been shown that CD4⁺ T cells with low or no expression of CD5 are less susceptible to Treg

induction. Although, the molecular mechanisms and the specific CD5 domains involved are currently unknown. Here, we show that CK2-CD5 binding domain is not involved in tTreg generation and suppressor function. Interestingly, CD5-CK2 binding domain deficient T cells present increased susceptibility to induce Treg and higher Foxp3 expression. Collectively, these results suggest other CD5 domains are involved in tTreg generation.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC) se caracterizan por la expresión constitutiva del marcador hematopoyético CD45, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II, CD11c y por no expresar marcadores del linaje T, NK, B, granulocitos o eritroide. Estas células expresan receptores que les permiten la identificación de patógenos y presentan la habilidad de capturarlos y procesarlos. En su estado inmaduro las células dendríticas expresan niveles bajos de MHC II y moléculas co-estimuladoras, lo cual lleva a una baja estimulación de las células T, que pudiera conducir a la inducción de tolerancia. Tras su activación, las DC disminuyen la capacidad de capturar antígenos e incrementan la expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras, incrementando así su capacidad de estimular a células T e iniciar respuestas inmunes [1].

4.1.1 Subpoblaciones de DC

Las DC murinas se pueden subdividir en DC convencionales (cDC) y DC plasmacitoides (pDC). Las cDC se caracterizan por la alta expresión de la integrina CD11c y de MHC II. Dentro de ellas podemos encontrar dos subpoblaciones, las CD8 α ⁺ (CD11c^{hi}/CD8 α ⁺/CD11b⁻/DEC205⁺/XCR1⁺) y CD8 α ⁻ (CD11c^{hi}/CD8 α ⁻/CD11b⁺/DEC205⁻/XCR1⁻). Las cDC presentan una gran capacidad de censar heridas en tejido y capturar antígenos del ambiente, así como la capacidad de procesar y presentar antígenos fagocitados a las células T. Las

pDC (CD11c^{int}/CD8α⁻/CD11b⁻/B220⁺/Gr-1⁺/PDCA1⁺) representan una pequeña subpoblación de DC, se acumulan principalmente en sangre y tejidos linfoides, expresan altos niveles de MHC II y bajos niveles de CD11c en homeostasis, tras el reconocimiento de ácidos nucleicos extraños producen grandes cantidades de Interferón (INF) tipo I [2].

En humanos, las DC XCR1⁺/BDCA3⁺/CLEC9⁺ son funcionalmente similares a las DC CD8α⁺ murinas, mientras que las DC CD1c⁺/XCR1⁻/BDCA3⁻/CLEC9⁻ presentan un patrón transcripcional similar a las DC CD8α⁻. Las pDC humanas, a diferencia de las murinas, no expresan CD11c y se caracterizan por la expresión de IL-3R y BDCA2, de manera similar a las murinas producen grandes cantidades de INFα en respuesta a virus [3-5]. En dermis, se ha descrito la presencia de DC CD1a⁺/CD14⁻, CD1a⁻/CD14⁺ y una discreta población de DC CD141⁺ que expresan XCR1, TLR3, CLEC9A y Necl2; poblaciones similares han sido reportadas en pulmón, riñón y lamina propia de ratones humanizados [6-8].

Las cDC están presentes en la mayoría de los tejidos linfoides y no linfoides. En tejidos linfoides podemos encontrar DC residentes CD8α⁺/CD11b⁻, localizadas en las zonas T en bazo y ganglios, y DC CD11b⁺/CD8α⁻ ubicadas en la zona marginal del bazo y en la región medular y capsular de los ganglios, las cuales presentan una localización ideal para filtrar los antígenos provenientes de la sangre y de los vasos linfáticos aferentes [9, 10]. Dentro de las cDC que se encuentran en tejidos no linfoides podemos encontrar dos subpoblaciones: las cDC CD103⁺ CD11b⁻ y las cDC CD11b⁺; adicionalmente, en piel, intestino y pulmón podemos encontrar una

población CD103+/CD11b+. Podemos encontrar otra población de DCs en la epidermis de la piel, denominadas células de Langerhans (LC) con fenotipo CD11c^{hi}/CD8α^{lo}/CD11b+/DEC205^{hi}/Langerina+/XCR1-/CD103-. Estas células se caracterizan por la expresión de altos niveles de Langerina y, a diferencia del resto de las cDC, no dependen de FLT3/FLT3L para su generación, sino que provienen de precursores radio-resistentes que se autorenewan y dependen de TGFβ, CSF1 e IL-34 [11].

4.1.2 Función de las DC

Las DC son consideradas células presentadoras de antígeno profesionales y son fundamentales para la activación de las células T por medio de la interacción del TCR con moléculas de MHC así como a través de la interacción de las moléculas co-estimuladoras en la DC con sus receptores en las células T. También son muy importantes para determinar el tipo de respuesta inmune que se genera al proporcionar un microambiente determinado por medio de la secreción de citocinas que permiten la diferenciación de las células T hacia diferentes fenotipos [2].

Las DC CD8α⁺ murinas y las DC CD103⁺ humanas tienen el mismo origen y presentan un fenotipo y perfil transcripcional similar. Están asociadas a la activación de células T CD8⁺ por antígenos virales y se caracterizan por tener una mayor capacidad para hacer presentación cruzada. Tras su activación, son las principales productoras de IL-12 e IL-15, con lo que favorecen la diferenciación hacia un fenotipo tipo Th1 [12-14]. En contraste, las DC CD8α⁻ pueden producir IL-10 y favorecer respuestas tipo Th2 [15, 16]. De igual manera, se ha reportado que las

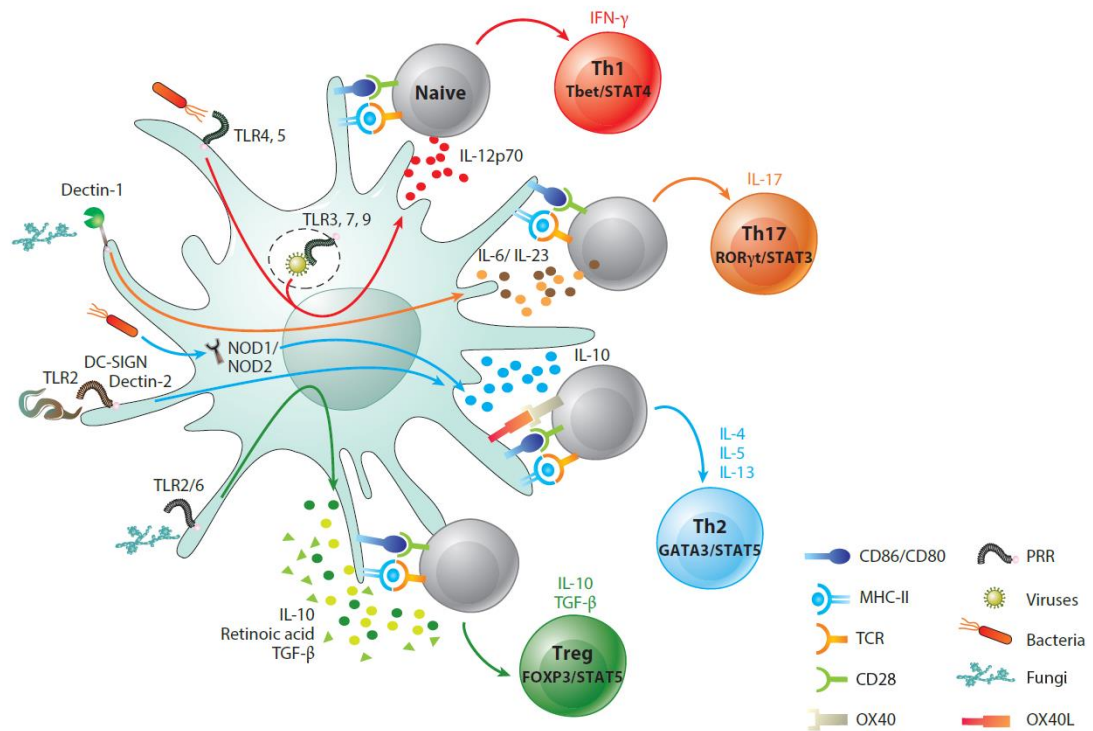


Figura 1. Modulación de la respuesta inmune por las DC. Las DC censan por diferentes receptores de reconocimiento de patrones los estímulos del microambiente, La activación de las DC por la mayoría de los TLR lleva a la producción de IL-12 y una diferenciación hacia Th1. La activación de TLR2 induce una mayor producción de IL-10, llevando a una diferenciación hacia Th2 o Tregs. La producción de IL-6 y IL-23 por las DC favorece una diferenciación hacia Th17, mientras que el metabolismo del ácido retinoico y la producción de TGF β induce la generación de Tregs [2].

células CD11c+/CD103+ presentes en intestino son más propensas a inducir respuestas tipo Th17, ya que producen IL-23, IL-6 y TNF α , dependiendo del tipo de microbiota presente [17, 18]. Las DC CD11b+ presentan un papel fundamental en la presentación de antígenos vía MHC II y, por lo tanto, en la activación y diferenciación funcional de células T CD4+. Por todas estas características, las DC se consideran iniciadoras y moduladoras de la respuesta inmune adaptativa (**Fig. 1**).

La importancia de las DC en la inducción de tolerancia inmunológica se demostró con la eliminación de esta población *in vivo*, tras la cual se desarrolló autoinmunidad espontánea [19]. Las DC en timo pueden ayudar a establecer tolerancia central al presentar antígenos propios a los timocitos en desarrollo, induciendo de esta manera la selección negativa o la generación de células T reguladoras tímicas [20].

Se ha observado que algunos subtipos de DC pueden migrar de manera constitutiva a los ganglios linfáticos en estado inmaduro, dando una baja estimulación a las células T e induciendo tolerancia inmunológica, ya que la presentación de bajos niveles de antígeno sin co-estimulación puede llevar a la generación de anergia [21, 22]. Por otro lado, se ha visto que mediadores anti-inflamatorios como IL-10, TGF β , prostaglandina E2 y los metabolitos de la vitamina D, pueden inducir un fenotipo tolerogénico en las DC [23]. También se ha demostrado que en mucosas como la del intestino, podemos encontrar DC CD103+/CD11b- capaces de inducir la generación de células T reguladoras por un mecanismo dependiente de ácido retinoico (AR) [24-26]. Adicionalmente, se ha observado que el triptófano puede ser metabolizado en agonistas para el receptor de hidrocarburos de arilo gracias a la acción de enzimas provistas por la flora comensal y la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) liberada por las DC. Los metabolitos generados inducen la producción de citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-27 por parte de las DC, lo que lleva a una mayor generación de células T reguladoras [27, 28]. Finalmente, se sabe que la mucosa del intestino está altamente inervada y expuesta a una gran cantidad de neurotransmisores. En esta estructura anatómica, se ha reportado que la

norepinefrina inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y favorece la producción de IL-10 [29].

4.2 Células T reguladoras

El sistema inmune tiene la capacidad de detectar patógenos para montar una respuesta inmune efectora y erradicarlos; sin embargo, también tiene la capacidad de reconocer antígenos propios, provenientes de la dieta o ambientales, así como aquellos presentes en la flora comensal; una respuesta inmune efectora contra éstos podría inducir una inflamación exacerbada y daño a tejidos. Por ello, existen mecanismos de auto-regulación que permiten limitar las respuestas inmunes.

Existen muchas poblaciones celulares que presentan propiedades regulatorias. Sin embargo, una de las más importantes y mejor estudiadas es la población de células T reguladoras (Tregs), las cuales representan una población de células T CD4+ (5-10%) caracterizadas por la expresión del factor transcripcional Foxp3 [30, 31]. La relevancia de esta población celular en la regulación de la respuesta inmune se observó con los ratones *scurfy* y en los pacientes con síndrome IPEX (desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada a X), en ambos modelos se presentan mutaciones no funcionales en el gen de Foxp3 [32-34]. Adicionalmente, la expresión ectópica de Foxp3 en células T CD4+ convencionales les confiere una función y fenotipo regulador [30, 31]; sin embargo, no todas las características genotípicas y fenotípicas de las Tregs dependen de Foxp3, por lo que requiere de la cooperación con otros factores para poder generar el fenotipo y total funcionalidad de las Tregs [35, 36].

Las células T reguladoras se caracterizan por la expresión constitutiva de Foxp3, la alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), CD5, CTLA-4, GITR, ICOS, así como por una baja expresión de la cadena alfa del receptor de IL-7 (CD127). Dependiendo de su ontogenia, se dividen en dos grandes poblaciones, aquellas generadas en timo conocidas como Tregs tímicas (tTregs) y aquellas que se diferencian a partir de células T CD4+ vírgenes, cuando este proceso se da *in vivo* se conocen como Tregs periféricas (pTregs) y cuando ocurre *in vitro* como Tregs inducidas (iTregs) [37]. Hasta el momento, no se ha descrito un marcador que nos permita diferenciar estas subpoblaciones; sin embargo, los marcadores más usados para dicho efecto son la expresión de Helios y Nrp1, los cuales se expresan principalmente en tTregs [38-40]. Adicionalmente, el grado de desmetilación de Foxp3 también se ha considerado para poder diferenciar entre estas subpoblaciones; en un inicio fue reportado que las tTregs presentaban una mayor desmetilación que las Tregs inducidas, lo cual les confería una mayor estabilidad; sin embargo, se ha demostrado que las pTregs también se presenta un alto grado de desmetilación, mientras que en las iTregs se encuentran un mayor grado de metilación [41, 42].

Se han descrito múltiples mecanismos por los cuales las Tregs ejercen su función supresora incluyendo (**Fig. 2**): (1) la producción de citocinas como IL-10, TGF β , e IL-35; (2) citólisis por medio de perforina, granzima A y B [43-45]; (3) la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 que catalizan la conversión del ATP en adenosina

e inhiben la proliferación de las células efectoras y suprimen la función de DC [46];

(4)

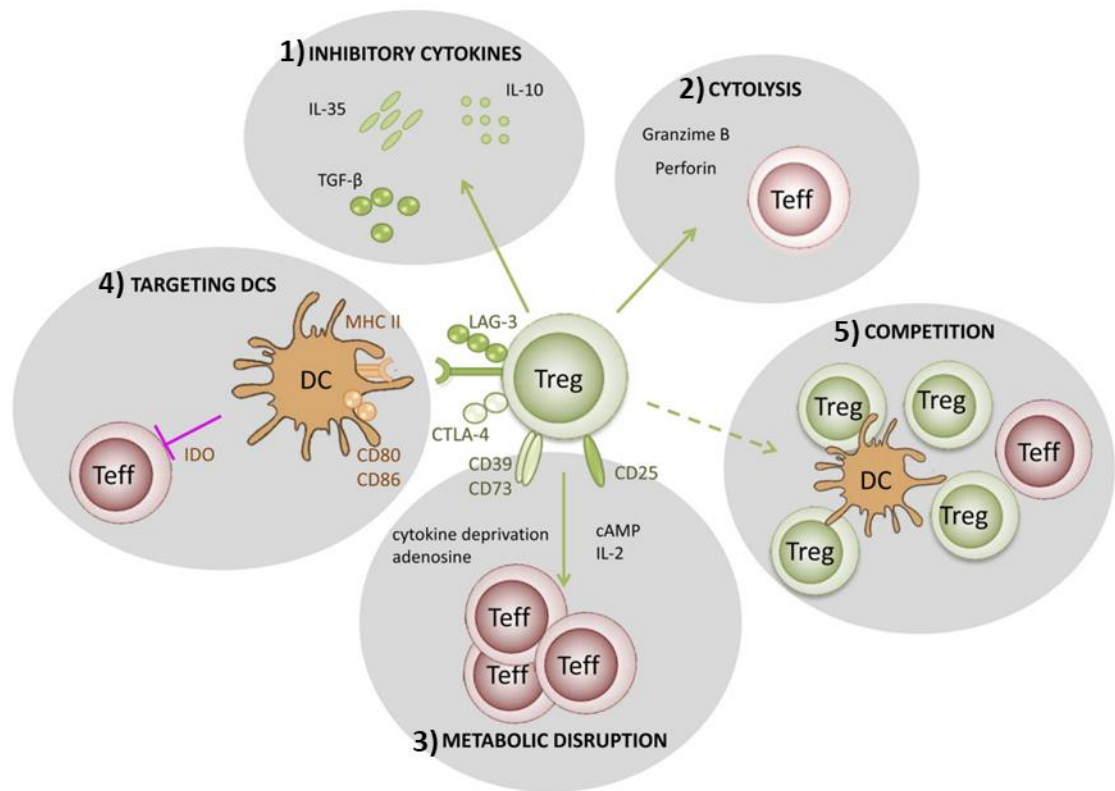


Figura 2. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras. (1) Producción de citocinas anti-inflamatorias, (2) mecanismos de citólisis, (3) la disrupción metabólica incluye la privación de citocinas, la inhibición mediada por AMP cíclico y la inmunosupresión mediada por el receptor de adenosina. (4) Modulación de las células presentadoras de antígeno. (5) Competición por citocinas y el encuentro con las células DC entre las Tregs y las células T efectoras [47]

la privación de citocinas, al expresar niveles altos de CD25 y consumir altos niveles de IL-2, compitiendo con la proliferación de las células efectoras [48]; (5) la modificación de las DC, promoviendo un fenotipo tolerogénico en las DC por medio de CTLA-4, el cual disminuye la expresión de CD80 y CD86 e induce la producción

deIDO por las DC, favoreciendo el catabolismo de triptófano a kineurinas, las cuales inhiben la proliferación de los linfocitos T [49]. De igual manera, se ha descrito que LAG 3 y Neuropilina 1 (Nrp1) expresados en la Treg pueden inducir un fenotipo tolerogénico en las DC [50, 51].

4.2.1 Tregs tímicas (tTregs)

Se ha demostrado que la generación de tTregs se induce por señales fuertes del TCR tras el reconocimiento con alta avidéz de antígenos propios presentados en el contexto de MHC por las APC tímicas, lo cual lleva al incremento en la expresión de CD25, CD5 y CTLA-4 en estas células, por lo cual se dice que las tTregs presentan un fenotipo activado [52]. De la misma manera, la expresión retroviral de TCR encontrados en Treg o T convencionales en células T efectoras demostró que los TCR de Treg presentan una mayor reactividad a lo propio, lo cual tiene como resultado una mayor proliferación celular y una mayor propensión a generar autoinmunidad, por lo que se considera que el repertorio de las tTregs tiene un sesgo hacia lo propio [53]. Estos resultados sugieren que la generación de Tregs requiere de un ligando cuya afinidad este entre aquella que lleva a la selección positiva de las células T CD4+ convencionales y menor que aquella que media la selección negativa.

Además de la estimulación a través del TCR, varias condiciones experimentales favorecen la inducción de Foxp3, incluyendo la señalización constitutiva de NF-κB, deficiencias en mTOR o en S1P1, así como una reducción en la señalización mediada por PI3K [54]. La co-estimulación por CD28 también juega un papel central

en la generación de tTregs: deficiencias en CD28, CD80 o CD86, llevan a una disminución en los números de tTregs [55, 56]. El coestímulo por medio de CD28 activa factores como NF- κ B, NFAT, AP-1 y FOXO los cuales están implicados en el control transcripcional de la diferenciación hacia tTregs. NFAT y AP-1 se unen al promotor de Foxp3, mientras que FOXO se une al promotor y a las regiones no-codificantes conservadas 2 y 3 (CNS2 y CNS3) [57].

Señales adicionales para la diferenciación de Tregs incluyen IL-2 y en menor medida IL-7 e IL-15; citocinas que señalizan a través de la cadena γ y del receptor α a citocinas. Ratones deficientes en IL-2 o la cadena alfa de su receptor presentan una importante reducción de Tregs, mientras que la pérdida de IL-15 o IL-7 no tienen un efecto en la generación de Tregs; sin embargo, la ausencia de estas tres citocinas o de la cadena γ común lleva a una pérdida total de las Tregs [58, 59].

Basados en estos conocimientos surge el modelo que propone dos pasos para la generación de Tregs, el primer paso es la alta señalización a través del TCR, lo que lleva a un incremento en la expresión de CD25 y a un incremento en la sensibilidad hacia IL-2. El segundo paso depende de la señalización del receptor de IL-2 que lleva a la activación de STAT5, el cual se une a la región CNS2, favoreciendo su desmetilación y con ello la estabilización de la expresión de Foxp3 (**Fig. 3A**) [60, 61]. Inicialmente, se creía que TGF β era esencial para la generación de tTregs, sin embargo, las observaciones en este sentido han sido contradictorias, estudios más recientes consideran que TGF β tiene un papel importante en la supervivencia de las tTregs y sus precursores [62].

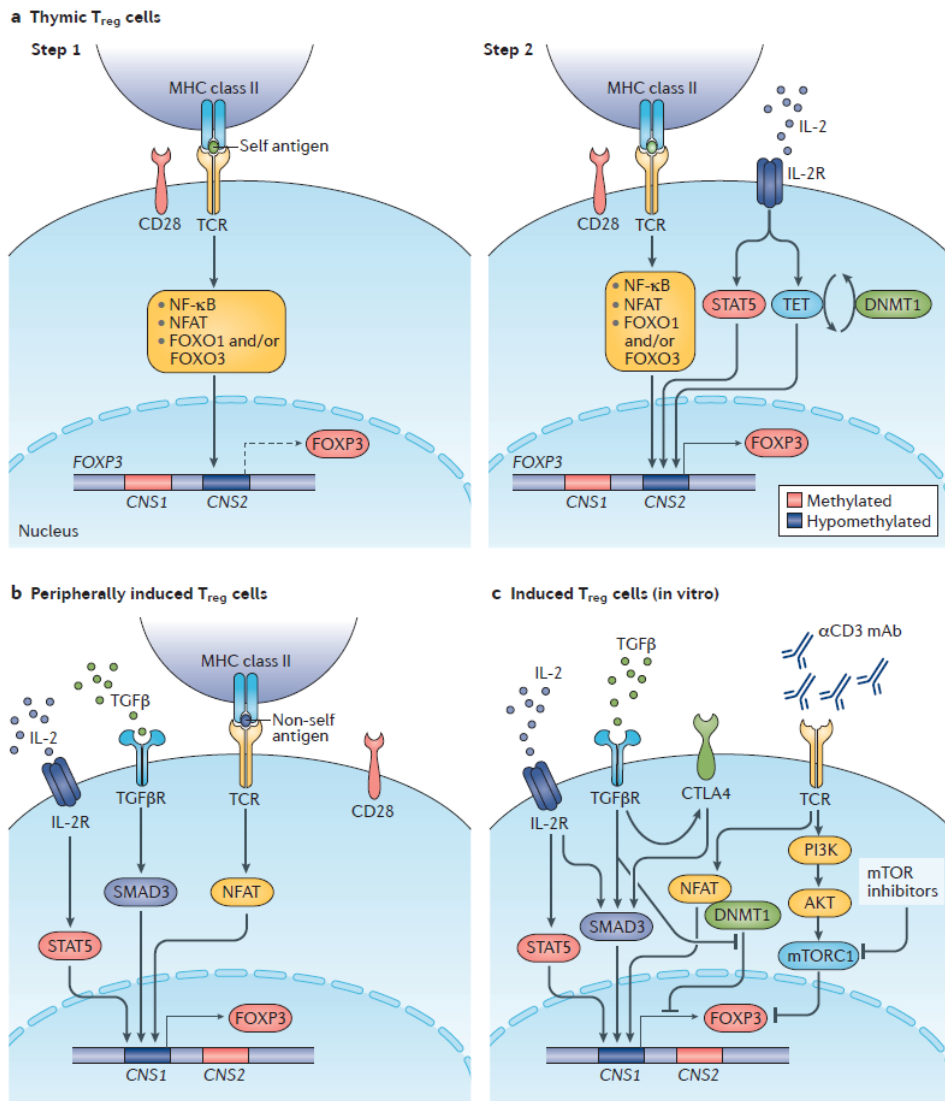


Figura 3. Desarrollo de células T reguladoras. A) El desarrollo de tTregs requiere de dos pasos, la estimulación con alta avidéz del TCR y la señalización a través de la IL-2. B) Las pTregs *in vivo* se generan fuera del timo a partir de células T CD4+ vírgenes en respuesta a estímulos del TCR en presencia de IL-2 y TGFβ, principalmente en mucosas. C) Las iTregs se generan *in vitro* a través de la estimulación del TCR, principalmente con anticuerpos, en presencia de TGFβ, estas células a diferencia de las tTregs o pTregs presentan un fenotipo menos estable [63].

4.2.2 Tregs periféricas (pTregs)

A diferencia de las tTregs, las pTregs se generan en contra de antígenos no propios, como aquellos presentes en la flora o la dieta. Sin embargo, al igual que las tTregs

la afinidad del TCR hacia su antígeno es alta [64]. La generación de pTregs está favorecida por la co-estimulación a través de CTLA-4, mientras que la co-estimulación a través de CD28 puede inhibir su generación. De igual manera, se ha observado que el reconocimiento crónico de antígenos en condiciones homeostáticas o no inflamatorias, como aquellos antígenos de la microbiota o el ambiente, favorecen la generación de pTregs [54]. Se ha reportado también que la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR favorece la generación de estas células [65].

Adicionalmente, la presencia de grandes cantidades de TGF β favorecen la generación de pTregs. La importancia de esta citocina se demostró en el ratón deficiente de TGF β -1 el cual presenta un desarrollo normal de tTregs pero una importante disminución de pTregs [66]. La señalización de TGF β puede favorecer la generación de pTregs por mecanismos directos e indirectos que incluyen la unión de Smad3 a la región CNS1 de Foxp3 junto con NFAT, la inhibición del reclutamiento de Dnmt1, y la señalización a través de su receptor para permitir la supervivencia de las Tregs [67-69]. IL-2 también es requerido para la generación de pTregs, se ha demostrado que ratones deficientes de IL-2 o STAT5 presentan una marcada disminución en la generación de pTregs; adicionalmente, se demostró que el papel de IL-2 no es redundante, ya que ninguna de las citocinas que utilizan la cadena γ y común pueden revertir este efecto (**Fig. 3B**). Finalmente, ha sido reportado que IL-2 es importante para la supervivencia, estabilidad y función de las pTregs [68, 70, 71].

A pesar de que las pTregs representan un pequeño porcentaje dentro del total de las Tregs, éstas se encuentran altamente enriquecidas en mucosas que sirven como interfases con el ambiente; por ello, se considera que son fundamentales para el establecimiento de tolerancia hacia la microbiota, los alimentos, alérgenos ambientales e inclusive hacia el feto durante el embarazo [72]. En este sentido, las DC CD103+, presentes en mucosa, secretan grandes cantidades de TGFβ y ácido retinoico; este último induce la unión del receptor de ácido retinoico (RAR) a la región CNS1 de Foxp3, favoreciendo su desmetilación, lo cual facilita la unión de Smad3 a este sitio [24, 25]. De igual manera, se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota, especialmente por las bacterias del género *Clostridia*, favorecen la generación de pTregs [73, 74].

4.3 CD5

4.3.1 Generalidades

CD5 es una glicoproteína tipo I de 67 KDa, miembro de la super familia de los Receptores “Scavenger” Ricos en Cisteína (SRCR). Esta proteína está expresada por todos los timocitos y células T maduras, en ratones, CD5 sirve para diferenciar una población de células B denominada B1a, única subpoblación de células B que expresa CD5 [75, 76].

Existe una expresión diferencial de CD5 en distintas subpoblaciones de linfocitos. Los timocitos CD4+SP expresan los niveles más altos de CD5, seguidos por células T CD4+ de bazo, timocitos CD8+SP, células T CD8+ de bazo y timocitos

CD4+CD8+, mientras que las células B1a expresan los niveles más bajos [77, 78]. Recientemente, ha sido reportado que las células DC CD1c+ humanas se pueden clasificar en CD5^{alto} y CD5^{bajo}, de igual manera se ha reportado que dentro de las células DC residentes de piel hay un subtipo de células de Langerhans y un subtipo de células dermales que expresan CD5 [79-81].

La región promotora de CD5 presenta 3 sitios potenciales a los cuales se pueden unir factores de transcripción, los sitios CCAAT, κE2 y ETS. La proteína ETS-1 se une a la región de unión a ETS, la delección de este sitio lleva a una represión de la expresión de CD5. La región promotora de CD5 presenta 2 sitios que flanquean la región de unión a ETS, nombrados CD5X y CD5Y, los cuales presentan una importante función moduladora de la expresión de CD5 [77]. La unión de E47 al sitio κE2 se demostró por medio del uso de líneas con mutaciones en este sitio, la ausencia de esta interacción lleva a una mayor activación del promotor de CD5. Por otra parte, se ha reportado que durante el desarrollo tímico se presenta una represión de E47 y esto correlaciona con una mayor expresión de CD5. Finalmente, la estimulación de ratones deficiente de Rag-2 con anti-CD3 *in vivo*, mostró una reducción de la expresión de E47 y un incremento de CD5 en superficie en timocitos DN3. Consistente con esto se demostró que la activación *in vitro* de células DP con anti-CD3 lleva a la activación de la región promotora de CD5 [82].

4.3.1.1 Ligandos de CD5

CD72, glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (gp35-40, gp150 y gp200) y la región marco de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgVH) han sido

reportados como ligandos de CD5 (**Fig. 4**). Adicionalmente, una interacción homotípica entre CD5 con el mismo CD5 ha sido reportada [83-85]. Estos ligandos han sido descritos con el uso de varias aproximaciones *in vitro*, a pesar de ello hace falta la comprobación de estas u otras interacciones con CD5 *in vivo* para demostrar cual es el ligando o ligandos endógenos de CD5.

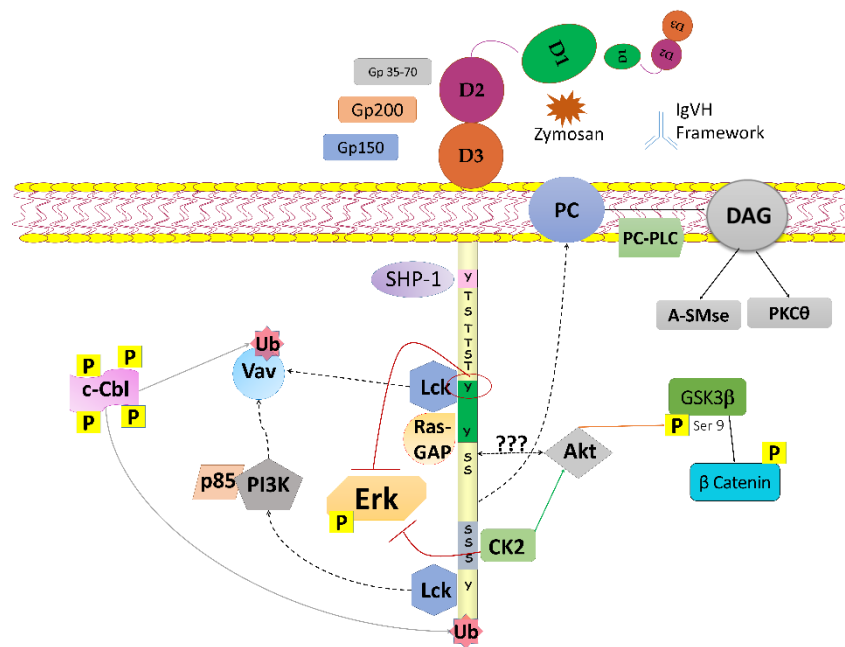


Figura 4. CD5 regula múltiples vías de señalización. Tras la activación por medio de sus dominios extracelulares, CD5 es capaz de modular múltiples vías de señalización. Por su dominio de unión de CK2, CD5 puede activar vías mediadas por AKT y regular negativamente la fosforilación de ERK. Adicionalmente, las tirosinas 429 y 441 pueden regular negativamente las señales del TCR y la supervivencia por medio de la inhibición de ERK. Se ha demostrado que la región terminal de CD5 puede regular la activación de C-Cbl y la degradación de Vav y el mismo CD5. Finalmente, se ha propuesto que CD5 puede modular otras vías como la fosforilación de VAV y PI3K mediada por LCK, así como la regulación negativa del TCR por medio de Ras-GAP.

4.3.1.2 *Dominios de señalización de CD5*

CD5 presenta un dominio funcional cerca de la región carboxilo terminal, el cual incluye las serinas S459 y S461. A esta región se une la Cinasa de Caseína 2 (CK2) por medio de su subunidad β , la cual es necesaria para la fosforilación de CD5 de manera basal y tras la activación [86, 87]. Adicional al dominio de unión a CK2 (CD5-CK2BD), la cola citoplásmica de CD5 presenta al menos 3 tirosinas y 2 treoninas que pudieran ser fosforiladas. El estudio de las tirosinas 429, 441 y 463 ha demostrado que tras la estimulación con pervanadato o anti-CD3 (OKT3), CD5 puede ser fosforilado en las tirosinas 429 y 463 por las cinasas Fyn o Lck y que la actividad de esta última cinasa es necesaria para la fosforilación de estos sitios *in vivo*. Por otro lado, se ha descrito que las treoninas 410 y 412, por medio de la activación de CD5, son importantes para la regulación de la producción de Diacilglicerol (DAG) mediada por PC-PLC [88].

4.3.2 Papel de CD5 en la modulación de las señales del TCR

4.3.2.1 *CD5 como un regulador positivo de las señales del TCR.*

Inicialmente se observó que la estimulación conjunta con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD5 de células de sangre periférica lleva a una mayor proliferación de células T comparado con una estimulación con sólo anti-CD3 [89]. Adicionalmente, se reportó que la estimulación de células T humanas con OKT3 únicamente no es suficiente para inducir la proliferación, mientras que la estimulación con OKT3 y anti-CD5 lleva a la proliferación. De igual manera, se demostró que este tipo de estímulo

lleva a una mayor expresión del receptor de IL-2 (IL-2R) y una mayor secreción de IL-2 [90]. Estos experimentos iniciales sugirieron que CD5 tenía un papel como regulador positivo/co-estimulador de las señales del TCR.

Se ha reportado que la estimulación única de CD5 induce vías de señalización diferentes e independientes a aquellas que se inducen en conjunto con la estimulación del TCR. De igual manera, se demostró que la estimulación de células T con monocitos y anticuerpos anti-CD5 soluble lleva a la formación y proliferación de linfoblastos. El hecho de que la señalización a través de CD5 se lleve a cabo sin activar el metabolismo de fosfatos de inositol y sin incrementar la concentración de calcio intracitoplásmico, pero induciendo la fosforilación de proteínas relacionadas a las vías de señalización del TCR, indica la activación de una vía alterna a la activación canónica del TCR y una comunicación cruzada entre las vías de señalización de CD5 y el TCR [91].

Finalmente, se ha reportado que la estimulación de CD5 en células Jurkat induce la producción de DAG de manera tanto dependiente como independiente de las señales del TCR. El mecanismo dependiente del TCR se da por medio del reclutamiento y la activación de PC-PLC, mientras que el mecanismo independiente induce la síntesis *de novo* de DAG independiente de PC-PLC [92, 93]. La región importante para la síntesis de DAG se encuentra en la región distal de CD5, sugiriendo que el CD5-CK2BD puede ser importante para dicho efecto.

4.3.2.2 *CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR.*

En 1995, la generación del ratón deficiente de CD5 (CD5^{-/-}) contradujo la visión que se tenía de CD5 como un regulador positivo de las señales del TCR, ya que se demostró que los timocitos CD5^{-/-} estimulados con anticuerpos anti-CD3 o PMA hiperproliferan en comparación con los timocitos WT. Posteriormente, se demostró que los timocitos CD5^{-/-} presentan una mayor movilización de calcio intracelular, así como una mayor fosforilación de PLC γ , de la cadena ζ de CD3, y de Vav, tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 solos o en conjunto con anticuerpos anti-CD4 [94, 95]. Por otro lado, en estudios realizados utilizando ratones transgénicos con diferentes afinidades del TCR y deficientes para CD5, se reportó de manera concluyente que CD5 modula la selección tímica regulando finamente la intensidad de las señales del TCR [96]. Estos resultados demuestran el papel de CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR en timocitos.

En cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en la regulación negativa de las señales mediada por CD5, se han propuesto distintas moléculas. Así, por ejemplo, se ha reportado una posible asociación de la fosfatasa SHP-1 con CD5 por medio del uso de proteínas quiméricas, en las cuales se usa la parte intracelular de CD5 y la parte extracelular de CD6 [97]. De igual manera, se ha demostrado la asociación de la ligasa de ubiquitina c-Cbl, RasGAP y PI3K con péptidos de CD5, los cuales contienen las tirosinas 429-441 o la tirosina 463 [98, 99]. La región que contiene las tirosinas 429-441 presenta una secuencia peptídica parecida a aquella de los dominios ITAM. Por otro lado, se ha reportado que la degradación de VAV

(una proteína importante para la señalización del TCR) mediada por c-Cbl, está asociada a la región carboxilo-terminal de CD5 [100]. En conjunto, los resultados refuerzan el papel de CD5 como un regulador negativo de las señales del TCR.

Se ha propuesto que CD5 tiene un papel diferencial en la modulación de las señales del TCR en células T maduras o en desarrollo. Esto se debe, a que la mayoría de los experimentos realizados con células T maduras o líneas celulares de células T maduras (Jurkat) han mostrado a CD5 como un regulador positivo de las señales del TCR, mientras que aquellos experimentos que lo muestran como un regulador negativo han sido realizados en células T en desarrollo. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación con anticuerpos anti-CD5 lleva a un incremento en la actividad de cinasa de CK2 asociada a CD5 en timocitos, pero no así en linfocitos T maduros de bazo [101]. A pesar de estos resultados, actualmente CD5 es reconocido como un regulador negativo de las señales del TCR.

4.3.3 CD5 como un regulador de la supervivencia celular

Se ha reportado que la estimulación de timocitos con anti-CD3 más anti-CD5 induce una mayor fosforilación de Erk y una mayor expresión de Bcl-2, moléculas conocidas por su papel anti-apoptótico. [102, 103].

De igual manera, por medio del uso de clonas de células T citotóxicas se mostró que las clonas más susceptibles a muerte inducida por activación (AICD) son aquellas que presentan la expresión de CD5 más alta y que la expresión ectópica de CD5 en células Jurkat inhibe la muerte por AICD tras la activación con PMA. De

manera interesante, se observó que la estimulación con anti-CD5 de linfocitos T citotóxicos induce la expresión de FasL [104]. En concordancia con la anterior, se demostró que en células T CD4+ autorreactivas la expresión de CD5 correlaciona con una mayor supervivencia, por un mecanismo mediado por Fas [105].

En un modelo de Esclerosis Autoinmune Experimental (EAE) se observó que los ratones CD5^{-/-} inmunizados con péptidos de Mielina de Oligodendrocitos (MOG) presentan una menor severidad de la enfermedad que los ratones WT. Este resultado es interesante, ya que CD5, al ser un regulador negativo de las señales del TCR, predecía una mayor activación de las células T participantes en la enfermedad y, por lo tanto, una mayor severidad de la misma. Sin embargo, este estudio demostró que, a pesar de presentarse una mayor activación de las células T en el ratón CD5^{-/-}, la menor severidad de la enfermedad se debía a un incremento en la AICD que presentan estas células comparadas con aquellas de ratones WT [106]. Todos estos trabajos demuestran que CD5 es un promotor de la supervivencia celular además de tener un papel como regulador de las señales del TCR; sin embargo, ¿cuál de sus dominios funcionales es el responsable de este papel?

Existen algunas evidencias que sugieren la respuesta a la anterior pregunta. Por ejemplo, al igual que lo observado en ausencia de CD5, la inducción de EAE es menos severa en ratones deficientes de CD5 que fueron reconstituidos con una mutante de CD5 que no presenta el dominio de unión a CK2, [107]. Además, en un modelo de ratones “*knock-in*” en el cual el CD5-CK2BD no está presente en el CD5

endógeno (CD5 Δ CK2), se demostró que la ausencia del CD5-CK2BD durante el desarrollo tímico induce una mayor generación de timocitos CD4+ Simples Positivos (SP) y a un menor número de timocitos dobles positivos (DP). En los ratones CD5 Δ CK2 se presenta una mayor apoptosis de las timocitos dobles DP, CD4+SP y CD8+SP, así como una mayor fosforilación de Erk lo cual tiene como resultado una selección positiva y negativa afectadas. De manera interesante, se observó el incremento de Erk fosforilado no correlaciona con un incremento en las señales proximales del TCR, ya que no se observó un incremento en la fosforilación de Zap70 o en la movilización de Ca²⁺ [108]. Esto sugirió, por primera vez, que el CD5-CK2BD regula tanto la supervivencia de las células T como la señalización del TCR por una vía no canónica durante el desarrollo tímico.

La vía de señalización de PI3K/Akt es de gran importancia para la regulación de la supervivencia y el ciclo celular [109]. Se ha observado que el dominio SH2 de la subunidad p85 de PI3K puede unirse a péptidos que contienen las tirosinas 429 y 441 o la tirosina 463 de CD5, uniéndose a este último péptido con una mayor afinidad. Posteriormente, se demostró que tras la activación de células T humanas con anticuerpos anti-CD28 y anti-CD5 en presencia de PHA se presenta una activación de PI3K; de manera interesante, esto no produce un incremento en la fosforilación de H2B dependiente de Akt [110]. En nuestro laboratorio se demostró que ratones deficientes de CD5 presentan una mayor hipoplasia tímica a las 12 semanas de edad que aquellos ratones CD5 WT, debido a un incremento en la apoptosis de los timocitos, lo cual correlaciona con una menor fosforilación de Akt

tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en los ratones CD5^{-/-}, sugiriendo que Akt tiene un papel importante en la supervivencia de timocitos mediada por CD5 [111]. De manera interesante, las tTregs de ratones CD5^{-/-} presentan una menor susceptibilidad a muerte que las tTregs de ratones WT; sin embargo, estas células no presentan diferencias en la fosforilación de Akt tras la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Esto sugiere que CD5 regula la activación de Akt diferencialmente entre linfocitos T vírgenes y Tregs.

El CD5-CK2BD parece presentar una función diferente en timocitos que en células T maduras. Se ha reportado que en timocitos los niveles de Akt fosforilado, tanto basales como tras la estimulación del TCR, no presentan diferencias si el CD5-CK2BD está presente o ausente, sugiriendo que otras regiones de CD5 deben ser las responsables de modular Akt en estas células [108]. Por otro lado, en células T maduras se ha demostrado que, en ausencia del CD5-CK2BD, se presenta una menor fosforilación de Akt tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 solos o en conjunto con anticuerpos anti-CD5, lo cual lleva a una menor fosforilación de GSK3 β ; sin embargo, si esto tiene un efecto sobre la supervivencia de estas células no ha sido determinado [112, 113].

Para analizar el papel de las tirosinas presentes en la cola citoplásmica de CD5 se crearon mutantes puntuales en las cuales las tirosinas fueron substituidas por alaninas, para volver estos dominios no funcionales. Tales proteínas mutantes fueron transfectadas y expresadas de manera estable en la línea celular EL4. Este estudio demostró que la ausencia de la tirosina 429 induce un incremento en la

apoptosis de estas células de manera basal y tras la activación con anticuerpos anti-CD3. De manera interesante, se observó que esta muerte no correlaciona con un incremento en la fosforilación de Akt, pero sí con un aumento en la fosforilación de Erk. Notablemente, la ausencia de la tirosina 441 o 463 induce una mayor muerte basal de estas células; sin embargo, este incremento no se correlaciona con los niveles de fosforilación de Erk o Akt [114]. En conjunto, estos datos sugieren que la región que contiene las tirosinas 429-441 actúa como un dominio ITIM más que como un dominio ITAM

A pesar de estos estudios, aun no se conocen completamente los mecanismos por los cuales CD5 regula la supervivencia de las células y si la fosforilación de Akt está realmente relacionada con este proceso. Adicionalmente, hace falta demostrar si las actividades de CD5 como modulador de la supervivencia celular y como modulador de las señales del TCR están relacionadas entre sí o son independientes el una del otra.

4.3.4 CD5 como un regulador de las respuestas inmunes

El sistema inmune tiene la capacidad de montar una respuesta funcional hacia una gran variedad de antígenos, al mismo tiempo, tiene la capacidad de evitar respuestas exacerbadas o no deseadas. Para ello existen distintos mecanismos de tolerancia central y tolerancia periférica. Entre los mecanismos de tolerancia central, se encuentran la selección negativa durante el desarrollo tímico y la selección de tTregs. Entre los mecanismos de tolerancia periférica se incluyen la inducción de

anergia, la generación de Tregs en periferia y la AICD. De manera interesante, CD5 ha estado involucrado en cada uno de estos procesos.

4.3.4.1 Papel de CD5 en la tolerancia central.

Los niveles de expresión de CD5 son directamente proporcionales a la avidéz con la cual reconocen las células T sus antígenos específicos a través del TCR [96]. Esta expresión juega un papel importante durante el desarrollo tímico. Se ha observado que el ratón CD5^{-/-} no presenta defectos obvios en el desarrollo tímico. Sin embargo, cuando se analiza el repertorio de TCRs presente en los ratones CD5^{-/-} se puede observar que presenta alteraciones importantes [94, 115]. En este sentido, se demostró que en sistemas de TCR transgénicos que presentan una alta avidéz a su péptido específico, la ausencia de CD5 tiene como resultado una marcada reducción en la población de timocitos DP, los cuales disminuyen su expresión de TCR e incrementan los niveles de expresión de CD69, lo cual está asociado con fuertes señales de activación. En contraste, en sistemas de TCR transgénicos que presentan una baja avidéz a su péptido específico, la ausencia de CD5 no tiene un efecto importante y se puede observar un desarrollo tímico normal [78, 94, 115]. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de CD5 solo impacta levemente la selección positiva en modelos de TCR de alta avidéz; sin embargo, inhibe de manera importante la selección positiva de modelos de TCR transgénicos de baja avidéz, en los cuales se observa una marcada disminución de timocitos SP

pero una celularidad tímica normal, esto sugiere que el incremento en la expresión de CD5 convierte la selección positiva en una no-selección en estos ratones [78]. En conjunto estos resultados demuestran que el efecto de CD5 en la selección tímica depende críticamente de los niveles basales de expresión de esta molécula en superficie, expresión que es regulada por la avidéz del TCR por su ligando (Fig 5).

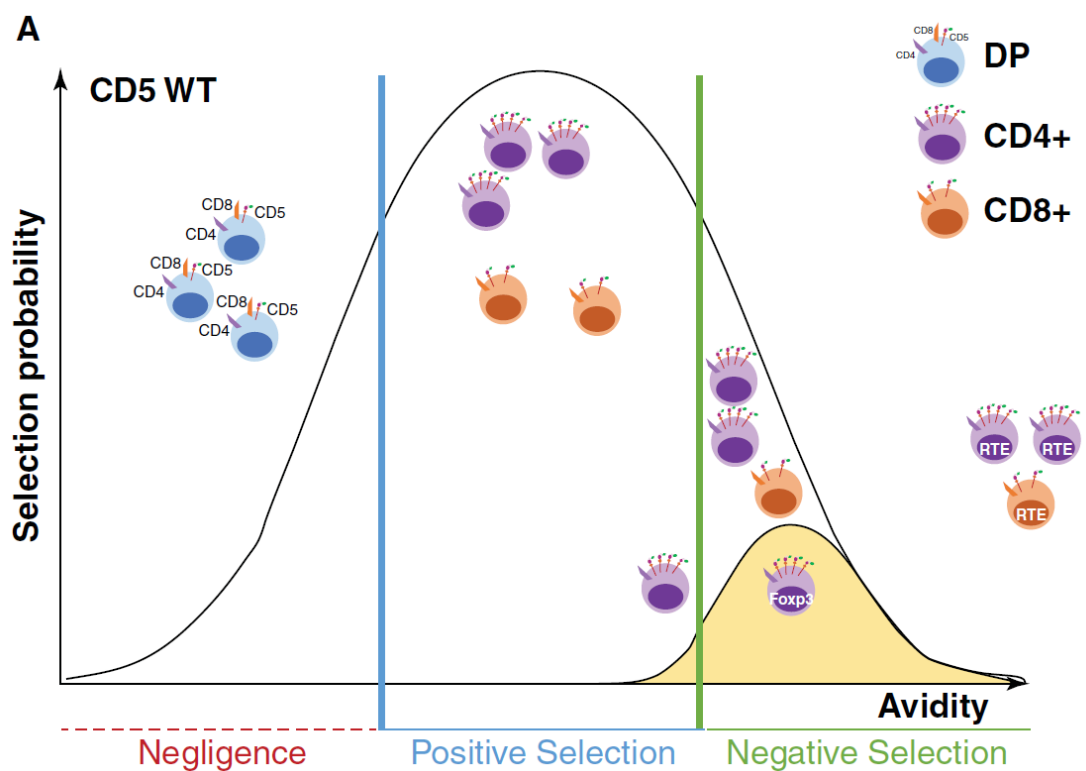


Figura 5. Papel de CD5 en el desarrollo tímico y la tolerancia central. Una adecuada selección durante el desarrollo tímico es esencial para la generación de tolerancia central. CD5 modula la selección de timocitos DP con niveles de avidézintermedios hacia timocitos CD4+ o CD8+ SP. Una alta avidéz del TCR promueve la selección negativa y la generación de células T reguladoras.

4.3.4.2 Papel de CD5 en la generación de anergia.

CD5 se ha relacionado con la generación de células T anérgicas. Se ha reportado que la exposición crónica de células T CD8+ a su antígeno específico lleva a un incremento en la expresión de CD5 y esto correlaciona con la generación de anergia en estas células [116]. De igual manera, se ha demostrado que los ratones CD5-/- presentan una mejor respuesta antitumoral contra melanomas B16 ya establecidos, debido a una mejor activación y una mayor secreción de citocinas por las células T CD8+ infiltrantes de tumor. Sin embargo, esta mejor respuesta antitumoral presente en los ratones CD5-/- es transitoria, ya que las células T CD8+ presentan una mayor muerte por AICD, sugiriendo que CD5 no solo es importante para la regulación de la supervivencia celular sino también en la generación de anergia (**Fig. 6A**) [117]. Adicionalmente, se ha demostrado que a mayor intensidad de la interacción entre el MHC con péptido y el TCR se presenta una mayor expresión de CD5. Esta mayor expresión correlaciona positivamente con una menor actividad antitumoral. En este contexto se observó que las células infiltrantes de tumor con menor expresión de pMHC llevan a una menor expresión de CD5, bajando de esta manera el umbral de activación de las células [118]. Estos resultados sugieren que las células CD8+ pueden modular la expresión de CD5 para superar el escape tumoral.

CD5 también se ha relacionado con la generación de anergia en células T CD4+. Se ha reportado que en ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 las células CD4+ son más resistentes a anergia. La inducción de EAE con dosis crecientes de

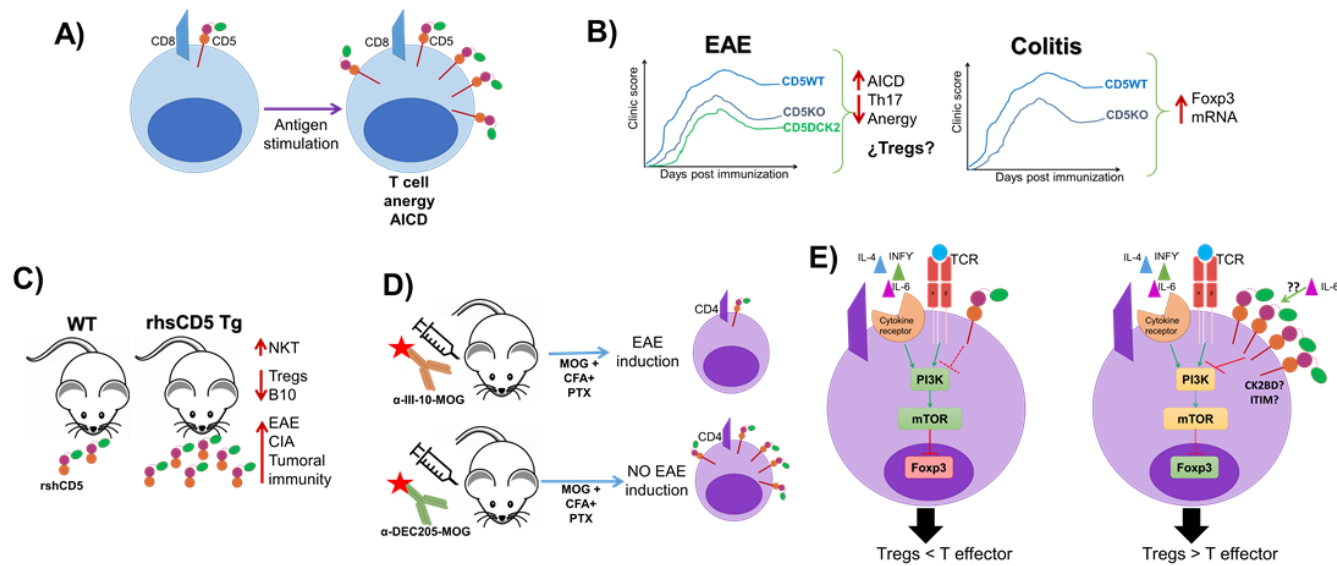


Figura 6. Papel de CD5 en la tolerancia periférica. CD5 se ha asociado con varios mecanismos de tolerancia. (A). La expresión de CD5 se incrementa en células T CD8+ que han sido crónicamente expuestas a su antígeno, induciendo anergia en estas células. (B) Se ha reportado que CD5 está involucrado en el desarrollo de varios modelos autoinmunes; en ausencia de CD5 estas enfermedades presentan un inicio retardado y una menor severidad. En el caso de EAE se ha asociado a un incremento en la muerte celular inducida por activación (AICD) y a una reducción en la anergia células y en la población Th17; mientras que en el modelo de colitis inducida por dextrano esto fue atribuido a un incremento en la expresión de mRNA de Foxp3 en las Tregs de colon deficientes de CD5. (C) CD5 se puede encontrar unido a membrana o en forma soluble, el modelo transgénico que sobre-expresa la forma soluble presenta un incremento en células NKT, y una reducción en Tregs y células B10, lo cual correlaciona con una mayor respuesta inmune. (D) En un modelo de EAE, se observó que el direccionamiento hacia DC con anti-DEC-205-MOG está asociado con una falta de inducción de la enfermedad, esto debido a un incremento en la expresión de CD5 en las células autorreactivas. Posteriormente, se demostró que el incremento en la expresión de CD5 favorece la generación de Tregs por un mecanismo que involucra la inhibición de la vía PI3K/mTOR activada por citocinas efectoras (IL-4, IL-6, INF γ).

MOG lleva a una menor severidad de la enfermedad en ratones WT. Este efecto no se observa cuando se utilizan ratones CD5^{-/-} o CD5 Δ CK2, lo cual demuestra que estos ratones no alcanzan la tolerancia. En este mismo trabajo se demostró *in vitro* las células T CD4⁺ CD5 Δ CK2 presentan una mayor activación y proliferación comparado con aquellas WT cuando son activadas con anticuerpos anti-CD3 o con péptidos MOG [113]. Estos resultados demuestran que CD5 participa en la generación de anergia en células T CD4⁺.

4.3.4.3 CD5 como regulador de diferenciación de células T CD4⁺.

CD5 también ha sido involucrado en la diferenciación de células vírgenes hacia las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺. Se ha reportado que el CD5-CK2BD es importante para una correcta generación de células Th2 y Th17, pero que no está involucrado en la generación de células Th1[113]. En este mismo estudio, se reportó que la ausencia de este dominio en un modelo de EAE lleva a una menor presencia de células Th17, así como de células co-productoras de INF γ e IL-17 en médula espinal. Estos resultados sugieren que la señalización dependiente de CK2-CD5 es importante para la generación de células Th17 o para la producción de IL-17 *per se* [113]. Se ha reportado que Akt incrementa la translocación nuclear de ROR γ t por medio de la activación de mTORC1 y S6K y es capaz de fosforilar a GSK3 β , lo que lleva a su inactivación, y reduce los niveles de fosforilación de STAT y NF κ B inducidos por la activación del receptor de INF γ [119]. En este contexto, recientemente fue reportado que la activación de CK2 por CD5 es

importante para la correcta diferenciación hacia Th17. Se ha observado que en ausencia del CD5-CK2BD tras la estimulación con anti-CD3 y anti-CD5 se presenta una menor activación de Akt en células T periféricas, lo cual lleva a una menor fosforilación de GSK3 β y por lo tanto a una menor inhibición de esta proteína; esto tiene como resultado un incremento en la fosforilación de STAT1 y STAT3, lo cual se refleja en una mayor expresión de Tbet. Esta mayor expresión de Tbet inhibe la translocación nuclear de ROR γ t, reduciendo la diferenciación hacia Th17. Estos datos sugieren un posible mecanismo a través del cual CD5 y, en específico, el dominio de unión a CK2, promueve la diferenciación hacia Th17 [112]. En línea con esto, ha sido reportado que la estimulación de células T CD4+ vírgenes con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD5, induce una mayor diferenciación hacia Th17 y que las células generadas son mejores productoras de IL-17, cuando son comparadas con aquellas células T CD4+ estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Esto se debe a un incremento en los niveles de expresión del receptor a IL-23 mediada por la estimulación de CD5, lo cual lleva a una activación de STAT3 sostenida y una mayor expresión de ROR γ t [120]. Los efectos inducidos por la estimulación de CD5 pueden ser revertidos por una estimulación fuerte de CD28, lo cual sugiere que otras células diferentes a las DC maduras son responsables de la diferenciación hacia Th17 y que las células responsables pueden expresar CD5. De manera interesante, a pesar de que el CD5-CK2BD tiene un papel en la regulación de la diferenciación hacia Th17 mediada por CD5, el incremento en la expresión del receptor a IL-23 no es dependiente de este dominio[113].

4.3.4.4 Papel de CD5 en la regulación de la respuesta inmune.

CD5 puede encontrarse de forma soluble en la sangre. Esta forma consta de los tres dominios extracelulares de CD5, que son escindidos de la forma anclada a membrana por un corte proteolítico tras la activación del TCR [121]. En un ratón transgénico que produce un exceso de la forma soluble de CD5 humano (shCD5) se presentó una reducción de la población de células B productoras de IL-10 (B10) en cavidad peritoneal y bazo; de igual manera, las Treg presentaron una disminución en LN mientras que se observó una mayor proporción de células NKT en el bazo del ratón. Las alteraciones en los porcentajes de estas células son consistentes con una mayor severidad en modelos de enfermedades autoinmunes como EAE y artritis inducida por colágeno, así como con una mejor inmunidad antitumoral observada en estos ratones (**Fig. 6C**) [122].

4.3.4.5 Papel regulador de CD5 en linfocitos B.

Se ha demostrado que las células B CD5⁺ son una de las principales productoras de IL-10 y representan una población de células B de larga vida. Consistente con esto, se ha observado que la expresión ectópica de CD5 en células Daudi (Linfoblastos de células B) lleva a la expresión de IL-10 y a una mayor sobrevivencia; de igual manera, se ha observado que tras la estimulación del BCR con anticuerpo anti-IgM se duplica la secreción de IL-10 por las células que expresan CD5 [123].

5 ANTECEDENTES

5.1 CD5 en otras poblaciones inmunes

Existen pocos estudios con relación a la expresión de CD5 en poblaciones inmunes diferentes a los linfocitos. Recientemente ha sido descrito que, en humano, las DC convencionales tipo 2 (cDC2), caracterizadas por la expresión de CD1c e IRF4 pueden ser divididas en dos subpoblaciones con base en la expresión de CD5. El estudio del transcriptoma de estas dos poblaciones demostró que aquellas que expresan niveles altos de CD5 (CD5^{hi}) expresan mayores niveles de los genes relacionados a cDC2, mientras que aquellas que expresan niveles bajos (CD5^{lo}) expresan preferencialmente genes relacionados con monocitos. Adicionalmente, se demostró que las cDC2 CD5^{hi} expresan mayores niveles de TLR3 y menores niveles de TLR7 y 8 comparadas con las cDC2s CD5^{lo}, lo cual genera una respuesta diferencial hacia los ligandos de específicos de estos TLRs. Las cDC2s CD5^{hi} presentan una mayor expresión de CCR7, una migración incrementada hacia CCL21 y se encuentran en mayor porcentaje dentro de las DC migratorias de ganglios linfáticos. En ensayos funcionales se demostró que las cDC2 CD5^{hi} inducen una mayor proliferación de células T y una mayor producción de IL-10, IL-17, IL-22 e IL-4, así como una mayor diferenciación hacia Tregs. En contraste, las cDC2 CD5^{lo} inducen una menor proliferación, pero un mayor porcentaje de células productoras de INF γ [79].

Otro estudio reportó que, en humanos, las células epidermales de Langerhans y las células dermales CD1a^{dim}/CD141- pueden subdividirse con base a la expresión de

CD5. Adicionalmente, la expresión de CD5 en estas poblaciones es estable e identifica poblaciones terminalmente diferenciadas. Estudios funcionales demostraron que las DC dermales CD5+ son mejores inductoras de la proliferación de células T CD8+ e inducen una mayor producción de granzima B, así como de INF γ y TNF α que las células dermales CD5-. De igual manera, las células dermales CD5+ inducen una mayor proliferación de células T CD4+, así como un mayor porcentaje de células productoras de IL-22 y una mayor producción de ésta, además de inducir un mayor porcentaje de células productoras de INF γ . Los mismos resultados fueron observados con células de Langerhans. En este trabajo también se reportó que la frecuencia de células CD5+ en dermis y epidermis se duplica en placas psoriásicas, comparado con piel no lesionada de pacientes psoriásicos [80]. Este estudio revela diferentes poblaciones de DC dentro de la piel con características funcionales y fenotípicas diferentes, y sugiere un papel de las células DC de piel CD5+ en la patogénesis de psoriasis.

Finalmente, se ha demostrado que en sangre, médula ósea y amígdalas de humanos existe una subpoblación de pDC caracterizada por la expresión de CD2, CD81 y CD5. Las pDC CD81+/CD5+ presentan una morfología con dendritas cortas que salen de la superficie y un núcleo irregular diferente a la morfología tipo linfocito de las pDC CD81-/CD5-; adicionalmente, presentan niveles más altos de CD86, CD80 y CD40 en condiciones basales y tras la activación con CpG, comparado con las pDC CD5-, lo cual es consistente con un fenotipo más maduro. A diferencia de las pDC convencionales (CD2^{lo}/CD81-/CD5-), las CD5+ no secretan grandes

cantidades de INF tipo I, consistente con la menor expresión de IRF7, pero secretan niveles comparables de IL-12p40, IL-6, IL-8 y otras citocinas proinflamatorias. Esta subpoblación induce una mayor proliferación de células B, una mayor formación de células plasmáticas y una mayor producción de anticuerpos. Adicionalmente, las pDC CD81+ CD5+ son mejores inductoras de la proliferación de células T, llevan a una mayor diferenciación hacia Tregs funcionales y una mayor producción de IL-10. En ratón se encontró una población análoga a las pDC CD5+ CD81+ con el mismo fenotipo funcional [81]. Estos resultados demuestran que dentro de las pDC CD2^{hi} se encuentran subpoblaciones identificables por la expresión de CD5 que son morfológica y funcionalmente diferentes.

Estos resultados demuestran que la expresión de CD5 marca subpoblaciones de DC fenotípica y funcionalmente diferentes. Sin embargo, aún se desconoce si CD5 es sólo un marcador de estas poblaciones o tiene una relevancia funcional en el fenotipo y función de las mismas.

5.2 Papel de CD5 en la generación de Tregs

Como se mencionó previamente, las Tregs son una parte fundamental de la tolerancia inmunológica. Se ha reportado que alteraciones en la expresión y/o función de proteínas como Zap70, LAT, PLC γ 1, DAG, CD3 ζ , PI3K, Akt, mTOR resultan en una generación alterada de Tregs [124]. La interacción de algunas de estas proteínas con CD5, así como su papel como regulador negativo de las señales del TCR sugiere que CD5 puede estar involucrado en la generación de células T reguladoras. En este contexto se ha reportado que la ausencia de CD5 lleva a un

incremento en el porcentaje y números totales de las tTregs. Las Tregs generadas en el ratón CD5^{-/-} presentan un menor porcentaje de células Anexina V⁺ y Caspasa 3 activa⁺ comparado con las tTreg de ratones WT, lo cual sugiere una menor susceptibilidad a la apoptosis. De manera interesante, las tTregs CD5^{-/-} presentan niveles incrementados de Erk fosforilado [111]. Este estudio, además, sugiere que en ausencia de CD5 las tTregs presentan una mejor capacidad supresora. De igual manera, en un modelo de colitis inducida por dextrano, los ratones CD5^{-/-} presentan un inicio retardado y una menor severidad de la enfermedad debido a un incremento en la expresión del mRNA de Foxp3 en las Tregs presentes en el colon (**Fig. 6B**) [125], sin embargo los mecanismos involucrados en este efecto no se han aun dilucidado.

Adicionalmente, en un modelo de EAE con inmunización dirigida hacia una población específica de DC (en el cual se usan anticuerpos anti-DEC205 acoplados a MOG) se reportó que la inmunización dirigida genera una resistencia a la inducción de EAE, lo cual es resultado de un incremento en la expresión de CD5 en las células T de los ratones tratados. Las células T con alta expresión de CD5 activadas tras la inmunización dirigida no responden a un segundo reto con MOG. De manera interesante, si estas células son re-estimuladas con anticuerpos anti-CD3 presentan una activación adecuada; por estos efectos opuestos con diferentes estímulos se les denominó células T “selectivamente anérgicas” (**Fig. 6D**) [126]. Recientemente, se reportó que el incremento de CD5 en estas células “selectivamente anergizadas” precede a la conversión de estas hacia un fenotipo de

Tregs. Este estudio, además, reporta que las células T CD4⁺ CD25⁻ deficientes de CD5 o que expresan niveles bajos de CD5 son menos susceptibles a la diferenciación hacia Tregs que aquellos con una alta expresión de CD5. Esto se debe a que la alta expresión de CD5 permite la inhibición de las señales generadas por citocinas efectoras (IL-4, IL-6, INF γ), las cuales inducen la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR que se ha descrito inhibe la generación de Tregs [127] (**Fig. 6E**).

Estos datos demuestran que CD5 modula la generación de Tregs por medio de la regulación de la respuesta hacia las citocinas en el microambiente, sin embargo, y de manera no excluyente, su función como regulador negativo de las señales del TCR podría participar en este mismo proceso. Adicionalmente, hace falta investigar cuál de los dominios funcionales de CD5 son los encargados de regular la generación de Tregs.

La vía PI3K/Akt/mTOR ha sido involucrada en la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia sus diferentes linajes y, en específico, se ha demostrado que la activación de esta vía inhibe la generación de Tregs [65]. De igual manera, se ha demostrado que CK2 es un regulador de la vía PI3k/Akt/mTOR y que puede favorecer la actividad de Akt de manera directa o por medio de la inhibición de PTEN [128]. Adicionalmente, se ha reportado que la delección de CK2 específicamente en Tregs no preseta un efecto en la generación de esta población; sin embargo, las Tregs deficientes de CK2 presentan una menor capacidad de suprimir respuestas inmunes de tipo Th2 [129]. En este contexto, se ha reportado que la inhibición farmacológica de CK2 en las células T CD4⁺ resulta en la inhibición de la generación

de células Th17 y en el incremento de la generación de Tregs por medio de la supresión de la vía PI3K/Akt/mTOR y una menor fosforilación de STAT3 [130-132]. De esta manera, la activación de CK2 mediada por CD5 podría tener un efecto en la regulación de la generación de Tregs.

6 JUSTIFICACIÓN

La expresión de CD5 en células linfoides y su papel en la biología de estas células ha sido ampliamente estudiado. Recientemente, la expresión de este marcador ha sido descrita en algunas poblaciones de DC humanas. Esta expresión puede identificar poblaciones con características fenotípicas y funcionales diferentes. Sin embargo, aún se desconoce la relevancia funcional de CD5 en estas poblaciones.

Por otro lado, desde su descubrimiento, las células T reguladoras fueron identificadas por la alta expresión de CD5 y se ha reportado que CD5 regula la diferenciación hacia fenotipos Th1 y Th17, principalmente por medio del CD5-CK2BD. De igual manera, se ha demostrado que CD5 juega un papel relevante en la generación tanto de tTregs como de pTregs. Por otro lado, el hecho de que CD5 se exprese en ciertas poblaciones de DC humanas, abre la posibilidad de que este receptor tenga un papel en la función tolerogénica de las DC. Sin embargo, aun se desconoce cuales son los mecanismos moleculares por los cuales CD5 regula la generación de Tregs y cual de los dominios funcionales de CD5 podrían ser relevante para los procesos de generacion y función de las Treg. Adicionalmente,

no se ha estudiado si la expresión de CD5 en las DCs tiene un papel relevante en la generación de Tregs.

7 HIPÓTESIS

CD5 actúa como receptor regulador de la respuesta inmune modulando la función de las células dendríticas y la generación de células T reguladoras.

CD5 regula la generación de células T reguladoras, así como la función de las mismas por medio del dominio de unión de CK2 a CD5.

8 OBJETIVOS

8.1 General

Evaluar el papel de CD5 en algunas funciones de las células dendríticas, así como en la generación de células T reguladoras inducidas.

8.2 Particulares

1. Evaluar la expresión de CD5 en células dendríticas de órganos linfoides y no linfoides.
2. Analizar el papel de CD5 en la diferenciación de DC *in vitro* y *ex vivo*.
3. Analizar el papel de la expresión de CD5 en las DC en la capacidad de estas células de activar células T *in vitro* e *in vivo*.
4. Analizar el papel de CD5 en DC en la inducción de células T reguladoras
5. Analizar el papel del CD5-CK2BD en la generación de Tregs *in vivo* en homeostasis.
6. Analizar el papel del CD5-CK2BD en la inducción de Tregs a partir de células T vírgenes *in vitro*.
7. Analizar el papel del CD5-CK2BD en la función supresora de las Treg.

9 MATERIALES Y METODOS

9.1 Ratones

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron ratones deficientes de CD5 (CD5^{-/-}), Foxp3.GFP y silvestres (WT) en fondo Balb/c, así como ratones CD5^{-/-}, deficientes del dominio de unión de CK2 de CD5 (CD5 Δ CK2) [113], OTII, OTI, 2D2, Foxp3.GFP y silvestres en fondo C57BL/6. Los ratones OTII y OTI presentan un TCR transgénico específico hacia ovoalbúmina cuya restricción es hacia MHC II y MHC I respectivamente [133, 134]. Los ratones 2D2 presentan un TCR transgénico específico hacia el péptido 35-55 de la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) [135]. Los ratones Foxp3.GFP co-expresan la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor endógeno de la proteína Foxp3 [136]. Machos y hembras de 5-10 semanas de edad fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las guías de los Institutos Nacionales de Salud, así como la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por los comités de ética "Institutional Animal Care and Use Committee" de la Universidad de Birmingham en Alabama y "Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)" del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (protocolo #108)

Los ratones WT Balb/c fueron comprados a Harlan, mientras que aquellos en fondo C57BL/6 fueron adquiridos de Jackson Laboratory con excepción de los ratones

CD5 Δ CK2, que junto con los ratones CD5 $^{-/-}$ fueron donados por el Dr. Chander Raman de la Universidad de Alabama en Birmingham.

Adicionalmente, los ratones CD5 $^{-/-}$ y CD5 Δ CK2 fueron retrocruzados con ratones Foxp3.GFP para los experimentos de inducción de células T reguladoras *in vitro*

9.2 Tipaje de ratones

Para la identificación de los ratones CD5 $^{-/-}$ y aquellos ratones con TCR transgénicos se realizó una tinción con anticuerpos. Para ello se obtuvo por punción de la vena retroorbital de 3 a 5 gotas de sangre, a la cual se le adiciono ACK para una lisis de eritrocitos, posteriormente se realizó la tinción con los anticuerpos correspondientes (cuadro 1), incubando por 15 minutos a 4°C en la oscuridad.

Cuadro 1. Anticuerpos usados para el tipaje de ratones

Ratones	Anticuerpos utilizados
CD5$^{-/-}$	Anti-CD4 y anti-CD5
OTII	Anti-CD4 y anti-TCR α 2
OTI	Anti-CD8 y anti-TCR α 2
2D2	Anti-CD4 y anti-TCR ν β 11

Los ratones Foxp3.GFP y CD5 Δ CK2 fueron tipados por medio de PCR a partir de DNA genómico obtenido de un fragmento de cola de ratón, dicho fragmento fue digerido con NaOH 50mM a 90°C por dos horas, posteriormente centrifugado por 10 min a 13,000 rpm y el sobrenadante obtenido fue utilizado como fuente de DNA genómico en la PCR. Los primers utilizados para la amplificación son los siguientes:

Foxp3.GFP: Dirección 5'--> 3': GCGTAAGCAGGGCAATAG

Dirección 3'--> 5': GCATGAGGTCAAGGGTGA

CD5ΔCK2: Dirección 5'--> 3': CGGTGTGGAAGTGCTGACCT

Dirección 3'--> 5': TGTTGGGATGGCAGACTGGTT

9.3 Obtención de células

Para todos los ensayos los ratones fueron sacrificados por medio de una cámara de CO₂.

9.3.1 Análisis de células T reguladoras

Timo, bazo, ganglios inguinales, axilares, maxilares (denominados ganglios periféricos) y ganglios mesentéricos fueron extraídos quirúrgicamente. Los tejidos fueron disgregados mecánicamente con ayuda de un embolo de jeringa y la suspensión celular fue recuperada para su análisis por citometría de flujo. Tras la disgregación mecánica se realizó la lisis de eritrocitos del bazo con una solución ACK.

9.3.2 Análisis de DC

Timo, bazo, ganglios (inguinales, axilares, maxilares) y pulmón fueron extraídos quirúrgicamente, los tejidos fueron cortados en pequeños fragmentos e incubados en medio RPMI suplementado con Colagenasa D (0.5mg/ml), DNAsa (25U/ml) y suero fetal bovino (SFB, 5%) por 1h a 37°C, posteriormente los tejidos fueron disgregados mecánicamente con la ayuda de un embolo de jeringa, se realiza la lisis de eritrocitos. Las suspensión celular fue recuperada para su posterior análisis por citometría de flujo.

Para el análisis de las DC de piel, un fragmento de piel fue rasurada y extraída quirúrgicamente, posteriormente fue incubada en medio adicionado con dispasa (25mg/ml) por 1-1.5h a 37°C. La epidermis fue separada de la dermis e incubada por 1.5-2hrs a 37°C en medio adicionado con tripsina (2.5%), ácido etilendiaminotetracético (EDTA, 1mM) y DNAsa (25U/ml). Por su parte, la dermis fue incubada por 1hr a 37°C en medio adicionado con colagenasa D (0.5mg/ml) y DNAsa (25U/ml). La suspensión celular fue recuperada para su posterior análisis por citometría de flujo.

9.3.3 Obtención de células CD11c+

Células de bazo fueron obtenidas como se describe en la sección 7.3.2. La suspensión celular fue incubada con anticuerpos anti-CD11c acoplados a perlas magnéticas y posteriormente separadas con un magneto, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA).

9.3.4 Obtención de DC a partir de médula ósea

Se obtuvieron la tibia y el fémur de ratones de los cuales se extrajeron las células de médula ósea con ayuda de una jeringa. 1×10^6 células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ por 5 días en medio RMPI suplementado con SFB (10%), Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, 10ng/ml, BD Biosciences, San Jose, CA) e Interleucina 4 (IL-4, 10ng/ml, Sigma St. Louis, MO). A las células generadas en estas condiciones de cultivo se las conoce como células

dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). Alrededor de un 95% de estas células expresan el marcador CD11c+.

9.4 Maduración de DC

Las células CD11c+ purificadas magnéticamente a partir de órganos linfoides secundarios o BMDC fueron incubadas en con 0.1 o 1 µg/ml de LPS (Sigma), respectivamente, por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂, una vez terminado el tiempo de incubación la suspensión celular fue recuperada para su análisis por citometría de flujo.

9.5 Análisis por citometría de flujo

Para el análisis de las células T y DC se realizaron tinciones con anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos dirigidos hacia proteínas de superficie y en algunos casos contra proteínas intracelulares. Para ello, las suspensiones celulares obtenidas por lo métodos anteriormente descritos fueron incubadas por 20min a 4°C en obscuridad con los anticuerpo descritos a continuación. Todas las suspensiones celulares fueron teñidas con el marcador de viabilidad Aqua Zombie (BioLegend, San Diego, CA) para la exclusión de células muertas.

Para el análisis de DC de bazo y ganglio la suspensión celular fue previamente incubada con anticuerpos anti-CD16/CD32, para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos acoplados a fluorocromos. Para la identificación de las células dendríticas se utilizó un coctel de linaje para excluir las células T (anti-CD3, 145-2C11), B (anti-CD19, 1D3), NK (anti-NK, 2B4) y eritrocitos (anti-Ter119, todos ellos

acoplados al fluorocromo PE; la población de dendríticas se encuentra dentro de la población negativa a todos estos marcadores. Para la identificación de las diferentes subpoblaciones de DC se utilizaron anticuerpos anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418), anti-CD8 α PE CY7 (53-6.7), anti-CD11b Violet Fluor 450 (M1/70), anti-CD103 biotinilado (2E7), anti-CD207 APC (eBioRMUL2), anti-CD5 Alexa Fluor 594 (53-7.3) y Streptavidina APC Cy7. La suspensión celular de pulmón fue teñida con el coctel de linaje y con anticuerpos anti-Gr1 PerCP (RB6-8C) and anti-F4/80 APC (BM8) para la discriminación de macrófagos pulmonares; adicionalmente, se tiñeron con anticuerpos anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418) and anti-CD5 Alexa Fluor 594 (53-7.3). Las células BMDC y CD11c⁺ fueron teñidas con anticuerpos anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-B7.-1 PE CY5 (16-10^a1), anti-CD11c PE CY7 (N418), anti-B7-2 APC (GL-1), anti-CD40 PE (3/23), anti-CD274 PerCP eFluor710 (MIH5) and anti-CD197 PE CF594 (4B12), para evaluar la maduración de dichas células (los anticuerpos utilizados provienen de las siguientes marcas: BD Bioscience, BioLegend, Tonbo Bioscience o eBioscience).

Para la evaluación de las poblaciones de Tregs las suspensiones celulares de bazo y ganglios (periféricos y mesentéricos) fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4 APC Cy7 (RM45), anti-CD8 PE Cy7 (53-6.7), anti-CD25 PE Cy5.5 (PC61.5), anti-CD5 Alexa Fluor 594 (53-7.3). Posteriormente, se realizó la tinción de proteínas intracelulares siguiendo el protocolo para citocinas intracelulares de BD

Biosciences, usando el Kit "Transcription Factor Staining Buffer Kit" (TNB-0607-KIT), utilizando los anticuerpos anti-Foxp3 APC (3G3) y anti-Helios FITC (22F6).

Las tinciones fueron adquiridas en los citómetros Accuri C6 (BD Biosciences) o Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) y analizadas con el software FlowJo (Tree Star Inc.)

9.6 Evaluación de la producción de citocinas por las DC

9.6.1 ELISA

Se realizó la separación magnética de células CD11c+ de bazo las cuales fueron estimuladas con 1µg/ml de LPS por 24h; se colectaron los sobrenadantes y la presencia de IL-12 e IL-23 fue evaluada por medio del Kit "ELISA Ready-SET-Go" siguiendo las instrucciones del fabricante (eBioscience).

9.6.2 PCR en tiempo real

Se obtuvo RNA total con TRIzol (GibcoBRL) a partir de las BMDC estimuladas o no con LPS por 24h. Posteriormente utilizando 2µg de RNA se sintetizó DNA complementario usando el kit de síntesis de DNA (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el Kit iQ SYBRO Green Supermix (Applied Biosystems) en el Sistema QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems). Para todos estos procesos se siguieron las instrucciones de los fabricantes. La expresión de los niveles de citocinas se normalizó con la expresión del gen constitutivo GAPDH en cada muestra y se representa como un nivel relativo para el análisis de los datos.

La secuencia de los primers utilizados para la evaluación de cada una de las citocinas se describen en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Primers utilizados para la evaluación de citocinas

Proteína	Dirección 5'--> 3'	Dirección 3'--> 5'
IL-12p35	5'-CACAAGAACGAGAGTTGCC-3'	5'-TCAAGTCCTCATAGATGCTACC-3'
IL-12p40	5'-ACGGCAGCAGAATAAATATGAG-3'	5'-GGAGAAGTAGGAATGGGGAG-3'
IL-23p19	5'-AGATCTGAGAAGCAGGGAAC-3'	5'-TGCCACTGCTGACTAGAAC-3'
IL-6	5'-GCCTCCCTACTTCACAAGTCC-3'	5'-TAGCCACTCCTTCTGTGACTCC-3'
IL-21	5'-TCATCATTGACCTCGTGCC-3'	5'-ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCCC-3'
TGF-β1	5'-ACCCTACTTCAGAATCGTCC-3'	5'-ACAGTTCAATCCGCTGCTC-3'
IL-1β	5'-CAAATCTCACAGCAGCAC-3'	5'-ACCGCTTTTCCATCTTCTTC-3'
IL-1α	5'-TCAGCACCTTACACCTACC-3'	5'-GCAACTCCTTCAGCAACAC-3'
TNF-α	5'-GAGCACAGAAAGCATGATCC-3'	5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
IL-4	5'-ACGGATGCGACAAAAATCAC-3'	5'-ACCTTGAAGCCCTACAGAC-3'

9.7 Activación de células T por DC

9.7.1 Proliferación de células T

9.7.1.1 Análisis de la proliferación *in vitro*

Las células T OTII o OTI fueron separadas magnéticamente usando anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8, respectivamente, acoplados a perlas magnéticas siguiendo las instrucciones de fabricante (Miltenyi Biotec, Inc.) y marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). 2×10^6 células OTII o OTI CFSE+ fueron co-cultivadas con 5×10^5 BMDC en placas de 96 pozos en presencia o ausencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₂₉ (OTII) o $1 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OTI). De la misma manera, células T 2D2 (CD4+) fueron separadas magnéticamente y teñidas con CFSE y posteriormente co-cultivadas con células de bazo CD11c+ en presencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de péptido MOG₃₅₋₅₅. Tras cuatro días de

cultivo, las células fueron adquiridas en el citómetro y el porcentaje de células en división fue evaluado.

9.7.1.2 Análisis de la proliferación *in vivo*

BMDC fueron estimuladas con péptidos específicos para MHC I o MHCII para posteriormente ser inyectadas subcutáneamente en el cojinete plantar en ratones WT (2×10^6 células/ratón). Tras la transferencia de BMDC, 6×10^6 células OTII u OTI marcadas previamente con CFSE fueron transferidas a cada ratón por inyección intravenosa. 4 días después los ganglios drenantes (ganglios poplíteos) fueron recuperados y se analizó la dilución del marcador CFSE por citometría de flujo para evaluar la proliferación de las células transferidas. La proliferación fue calculada como porcentaje de proliferación.

9.7.2 Producción de citocinas por las células T

9.7.2.1 Análisis de la producción de citocinas *in vitro*

Se purificaron células T OTII CD4+ y células CD11c+ de bazo. Las células T CD4+ fueron co-cultivadas con células CD11c+ o BMDC en presencia o ausencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₂₉, como se describe en la sección 7.7.1.1. Tras cuatro días de cultivo los sobrenadantes fueron colectados y la presencia de IL-2, IL-17 e INF γ fue evaluada mediante ELISA. De igual manera, en estos cultivos se evaluó el porcentaje de células productoras de citocinas para lo cual tras 4 días de cultivo las células fueron colectadas y estimuladas con ionomicina y PMA en presencia de un bloqueador del aparato de Golgi por 4h. Las células fueron posteriormente teñidas

con anticuerpo anti-IL2, anti-IL-4, anti-IL-17 y anti-INF γ para ser analizados por citometría de flujo.

9.7.2.2 Análisis de la producción de citocinas *in vivo*

Células CD11c⁺ purificadas de bazo WT o CD5^{-/-} y sensibilizadas con ácido dinitrobenzenosulfónico (DNBS) fueron transferidas a ratones WT, posteriormente de los ganglios drenantes de estos ratones fueron obtenidas células. 2x10⁶ células T fueron posteriormente co-cultivadas con 2x10⁵ WT BMDC sensibilizadas con DNBS. Tras 48h de cultivo los sobrenadantes fueron colectados y las concentraciones de IL-2, IL-17 e INF γ fueron medidos por ELISA.

9.8 Inducción de la respuesta antitumoral

1x10⁶/ml BMDC WT o CD5^{-/-} fueron estimuladas con 100 μ g/ml de proteína OVA como se ha descrito previamente [137]. Estas células fueron posteriormente transferidas a ratones WT por medio de una inyección subcutánea (2x10⁶ células en 200 μ L de PBS por ratón). Después de 7 días de haber realizado la transferencia de las BMDC, cada ratón fue inoculado subcutáneamente con 4x10⁶ células de la línea tumoral E.G7. El crecimiento tumoral fue medido cada 3 días en un ensayo doble ciego. El tamaño del tumor fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño del tumor} = \frac{\text{alto} \times \text{ancho} \times \text{largo} \times \pi}{6}$$

9.9 Respuestas de hipersensibilidad por contacto

Células CD11c⁺ de bazo o BMDC WT o CD5^{-/-} fueron incubadas con 5mM de DNBS por 15 min a 37°C, y a continuación fueron inyectadas subcutáneamente en ratones WT (1x10⁶ células por ratón). 5 días tras la transferencia los ratones fueron retados con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) en la piel de la oreja. La inflamación de la oreja fue medida 24h después del reto en un ensayo doble ciego. Ratones a los cuales no se les transfirieron células fueron usados como control.

9.10 Inducción de células Tregs

9.10.1 Inducción mediada por DC

La suspensión celular obtenida de bazo y ganglios periféricos de ratones Foxp3.GFP WT o CD5^{-/-} fue teñidas con anticuerpos anti-CD4 APC (GK1.5), anti-CD25 PE Cy5 (PC61), anti-CD44 PE (IM7) and anti-CD62L APC Cy7(MEL-14), las células CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻ fueron separadas utilizando separación electromagnética (sorting) en el citómetro FACS Aria I y posteriormente teñidas con CFSE. 125x10³ de estas células fueron co-cultivadas con 125x10³ células CD11c⁺ separadas magnéticamente de bazo de ratones WT o CD5^{-/-} en presencia anticuerpos anti-CD3 (1µg/mL) y TGFβ (5ng/mL). Tras 3 y 5 días de cultivo se evaluó la generación de células T reguladoras (CD4⁺/CD25⁺/Foxp3.GFP⁺) y la proliferación de las mismas por medio de citometría de flujo.

9.10.2 Inducción mediada por anticuerpos

Se obtuvieron células CD4+/CD25-/Foxp3.GFP- como se describe en la sección 7.10.1 usando el citómetro MoFlo CDP Cell Sorter, las células obtenidas fueron teñidas con Violet Cell Trace siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). 300×10^3 células/200 μ l fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio RPMI complementado con 2-mercaptoetanol (1x), aminoácidos no esenciales (1x), piruvato de sodio (1x) y SFB (10%). Las células fueron estimuladas en las siguientes condiciones:

Estímulo óptimo: anti-CD3 (2.5 μ g/ml) y anti-CD28 (2.5 μ g/ml) pegados a la placa

Estímulo subóptimo: anti-CD3 (1 μ g/ml) pegado a placa y anti-CD28 (2 μ g/ml) soluble.

Al estímulo subóptimo se le adicionaron diferentes concentraciones de TGF β humano recombinante (0, 1, 2 y 5 ng/ml) para promover la generación de células T reguladoras. Tras 3 y 5 días de cultivo las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 y el marcador de viabilidad Aqua Zombie. Se evaluó la generación de células T reguladoras (CD4+/CD25+/Foxp3.GFP+) y la proliferación de las mismas por medio de citometría de flujo.

9.11 Ensayo de supresión

Se obtuvieron células CD4+/CD25-/Foxp3.GFP-/CD44^{lo}/CD62L^{hi} (células vírgenes) y CD4+/CD25+/Foxp3.GFP+ (Tregs) como se describe en la sección 7.10.1 usando el citómetro MoFlo CDP Cell Sorter. Las células vírgenes fueron teñidas con Violet

Cell Trace. Se colocaron 25,000 células vírgenes en placas de 96 pozos y se adicionaron 12,500 Tregs en 200µl de medio RPMI suplementado con SFB (10%), 2-mercaptoetanol (1x), piruvato de sodio (1mM) y aminoácidos no esenciales (1x). Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de anti-CD3 y anti-CD28 (0.0625, 0.125, 0.25 µg/ml), para favorecer el entrecruzamiento de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, se adicionaron 0.5µg/ml de anticuerpo anti-IgG de hámster. Tras 5 días de cultivo la proliferación de las células fue evaluada por citometría de flujo.

9.12 Análisis Estadístico

Los datos experimentales fueron expresados como media \pm error estándar de la media (EEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon por medio de una prueba t de Student pareada de dos colas. Los valores de p menores a 0.05 implicaron un rechazo de la hipótesis nula y por tanto indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con al menos un 95% de confianza. (*p<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001).

10 RESULTADOS

10.1 La expresión de CD5 en DC y su papel en la regulación de respuestas inmunes

10.1.1 Las DC en órganos linfoides y no linfoides expresan CD5.

La expresión de CD5 en células T es ampliamente conocida, sin embargo, la expresión de esta molécula en otras células del sistema inmune ha sido muy poco estudiada. Por ello, investigamos si CD5 era expresado en DC de órganos linfoides incluidos el timo, bazo y ganglios, así como en órganos no linfoides como la piel y los pulmones de ratones WT. Los resultados obtenidos mostraron que CD5 se encuentra expresado en la población de células vivas Lin-/CD11+/Ia-IE+, correspondiente a la población de DC, en bazo y ganglios. Se observó las subpoblaciones CD8 α + y CD8 α - presentes en bazo expresan CD5 (**Fig. 7A**). La población de DC en ganglios puede ser subdividida en células residentes (Ia-IE^{lo}/CD11c^{hi}) y células migratorias (Ia-IE^{hi}/CD11c^{lo}) [138, 139]. Dentro de la población de DC residentes en ganglios, también se encuentran las subpoblaciones CD8 α + y CD8 α -, las cuales, al igual que sus contrapartes en bazo, expresan CD5 (**Fig. 7B**). Por su parte, dentro de la población de DC migratorias, podemos encontrar células de Langerhans (CD207+CD103-) y DC dermales (CD11b+, CD11b- y CD103+); en todas estas poblaciones se observó la expresión de CD5 (**Fig. 7B**).

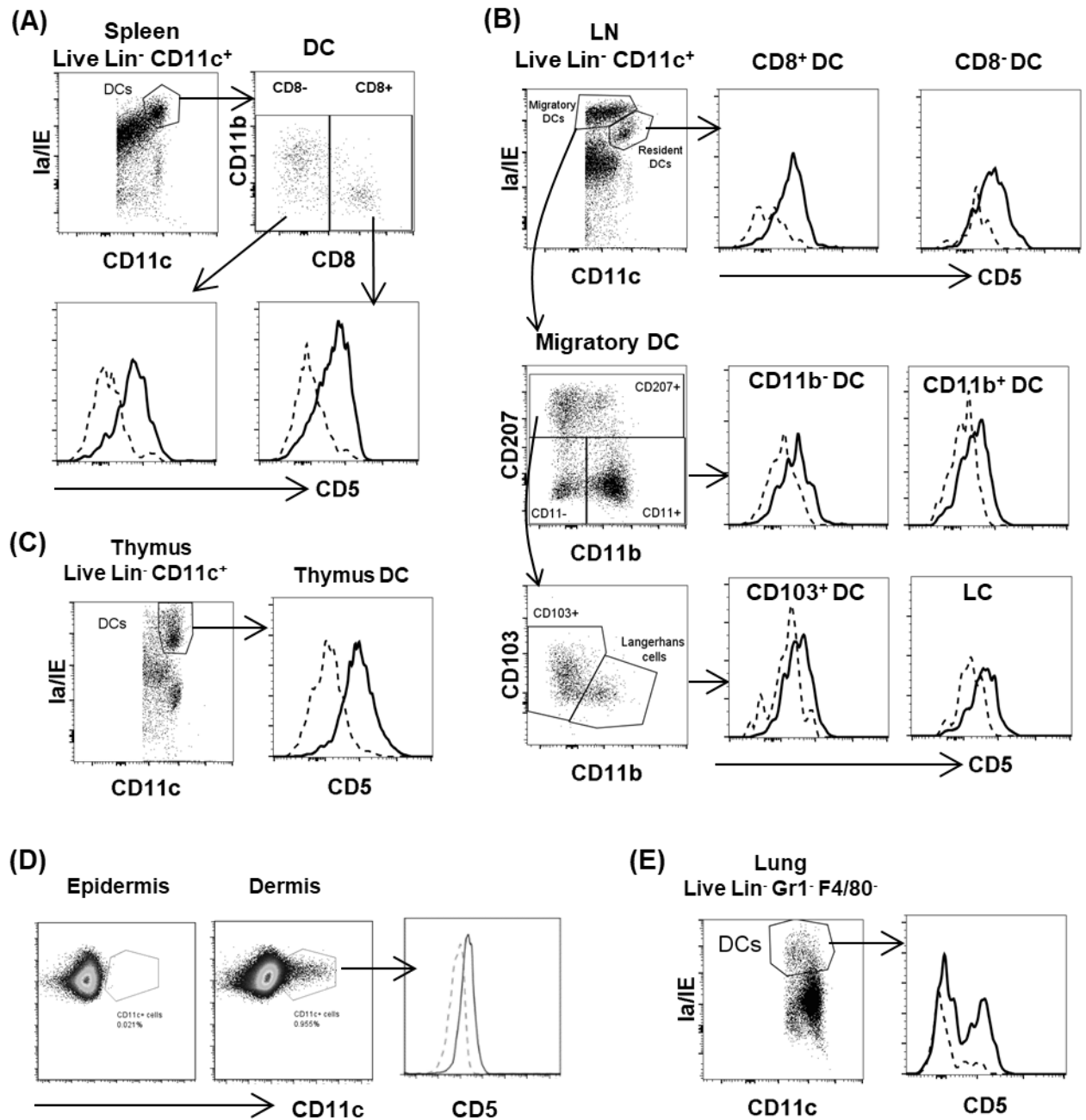


Figura 7 Distintas subpoblaciones de DC murinas expresan CD5. Se analizaron DC de varios órganos linfoides y no linfoides. En los histogramas, la expresión de CD5 (línea sólida) es comparada con la fluorescencia del control todos menos uno (FMO; línea punteada): (A) Expresión de CD5 en las DC de bazo (Lin⁻/CD11c⁺/Ia-IE⁺), ambas subpoblaciones, CD8 α ⁺ y CD8 α ⁻, expresan niveles comparables de CD5. (B) Expresión de CD5 en ganglios, DC residentes (Ia-IE^{lo}/CD11c^{hi}) y migratorias (Ia-IE^{hi}/CD11c^{lo}). La subpoblación CD8 α ⁺ y CD8 α ⁻ de DC residentes expresan niveles mayores de CD5 que las poblaciones migratorias conformadas por 4 subpoblaciones (CD11b⁺, CD11b⁻, CD103⁺ and Langerhans CD207⁺/CD103⁻) (C) Expresión de CD5 en DC de timo (Lin⁻/CD11c⁺/Ia-IE⁺) (D) Expresión de CD5 en DC dermales, Muy pocas células CD11c⁺ pueden ser detectadas en la epidermis (E) Expresión de CD5 en las DC de pulmón (Lin⁻/Gr1⁻/F4/80⁻/CD11c⁺/Ia-IE⁺). Los resultados son representativos de 2-3 experimentos independientes.

Por su parte, las células DC presentes en timo también expresaron CD5 (**Fig. 7C**). La evaluación de la expresión de CD5 en DC de órganos no linfoides demostró que las DC de dermis expresan niveles bajos de CD5; desafortunadamente, la epidermis contenía muy pocas DC como para evaluar de manera confiable la expresión de CD5 (**Fig. 7D**). Por su parte, se observó que las DC de pulmón Lin⁻/GR1⁻/F480⁻/CD11c⁺ también expresan CD5 (**Fig. 7E**). En conjunto, estos datos demuestran que CD5 es expresado por las DC en órganos linfoides y no linfoides.

10.1.2 Papel de CD5 en el desarrollo de DC.

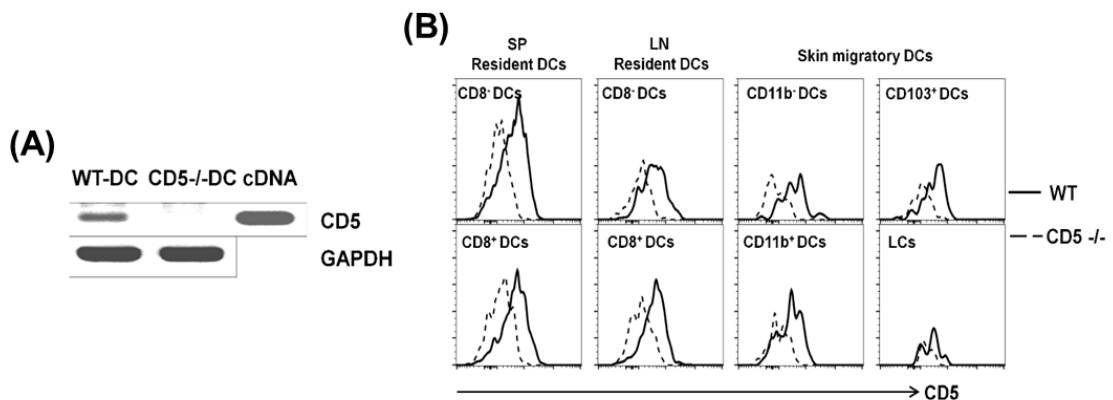


Figura 8. CD5 no es expresado en DC del ratón CD5^{-/-}. (A) BMDC fueron generadas a partir de ratones WT y CD5^{-/-} y la expresión de CD5 fue analizada por RT-PCR. Como control positivo se usó CD5 cDNA, como gen control de expresión constitutiva se usó GAPDH. (B) Se hizo el análisis de DC de bazo y ganglios como se describe en la **Figura 7** a partir de ratones WT y CD5^{-/-} y se evaluó la expresión de CD5 en superficie.

Una vez observada la expresión de CD5 en las DC nos preguntamos si CD5 funcionaba solo como un marcador o bien podría tener una relevancia funcional. El papel de CD5 en el desarrollo de las células T ha sido ampliamente reportado [140]. Por ello, nos preguntamos si la ausencia de CD5 tendría un efecto en el proceso de

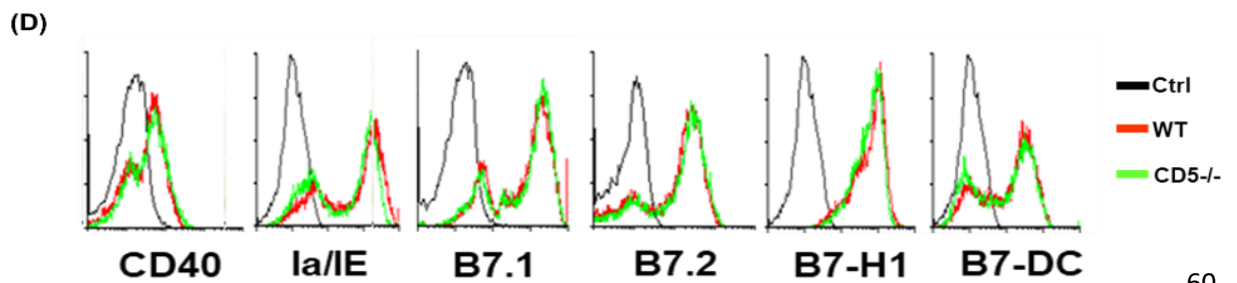
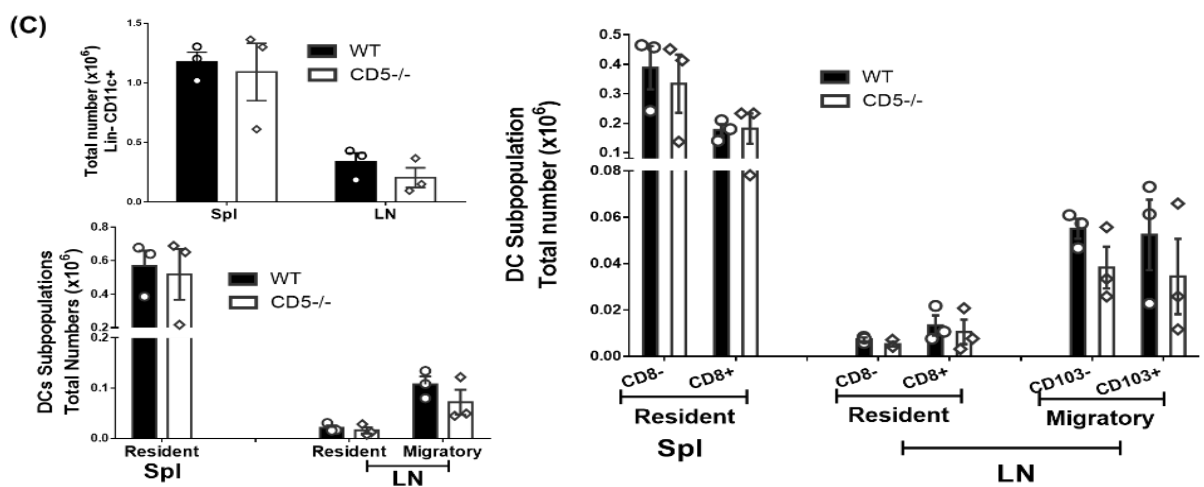
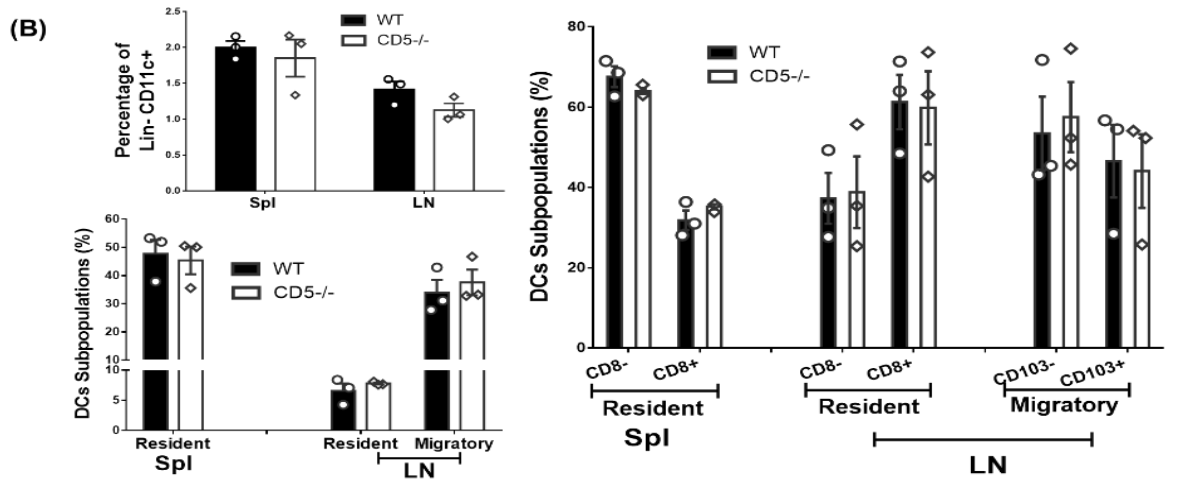
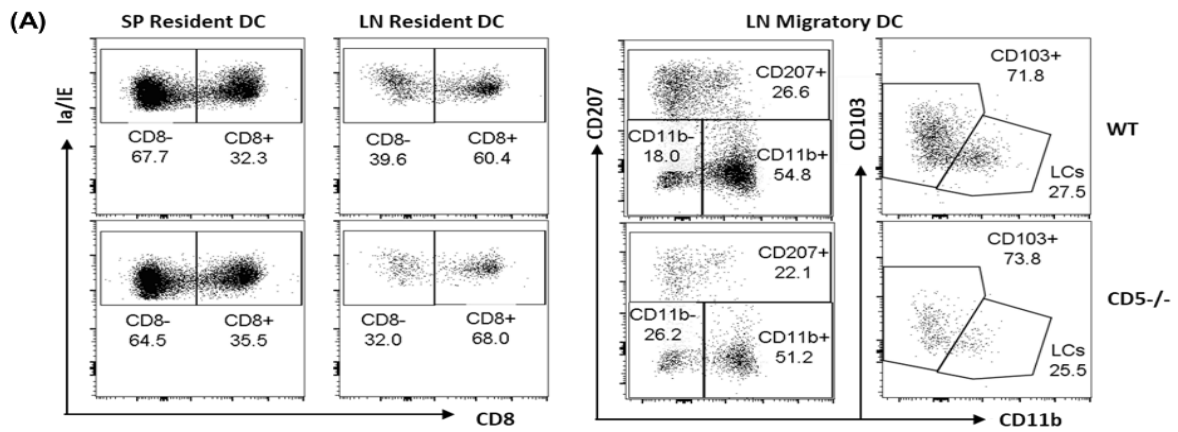


Figura 9. CD5 no está involucrado en el desarrollo de DC en homeostasis.

Bazo y ganglios de ratones WT o CD5^{-/-} fueron analizados. (A) DC de ratones WT (paneles superiores) y CD5^{-/-} (paneles inferiores) fueron analizadas como se describe en la Fig. 7. Los números en las gráficas indican el porcentaje de cada subpoblación de DC. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (B) Porcentajes y (C) números totales de la población de DC (Lin⁻/CD11c⁺) en bazo (Spl) y ganglios (LN), residentes (CD11c^{hi}/Class II^{+/hi}) en bazo y ganglio, migratorias (CD11c⁺/Class II^{+/hi}) en ganglios y de las subpoblaciones CD8α⁺ y CD8α⁻ entre la población residente y CD103⁺ y CD103⁻ dentro de la población migratoria. Los resultados se muestran como Promedio ± EEM, Prueba t de Student a dos colas. (D) Expresión de CD40, Ia-IE, B7.1, B7.2, B7-H1 and B7-DC en DC CD11⁺ de bazo de ratones WT (línea roja) y CD5^{-/-} (línea verde). Control (negro). Resultados representativos de 2-3 experimentos independientes.

diferenciación de las DC. Como primer paso se comprobó que CD5 no estaba expresado en las DC de los ratones CD5^{-/-} determinando la expresión de su mRNA (**Fig. 8A**) ni de proteína (**Fig. 8B**).

Una vez demostrado que CD5 efectivamente no se expresa en el ratón CD5^{-/-}, se evaluó si en ausencia de CD5 se presentaban cambios en la composición de las poblaciones de DC en bazo y ganglios. Los resultados obtenidos muestran que la ausencia de CD5 no afecta el porcentaje (**Fig. 9A y B**) ni los números totales de las poblaciones de DC (**Fig. 9C**). De igual manera, no se observan diferencias en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células DC residentes y migratorias (**Fig. 9A**). Finalmente, no se observan diferencias en los niveles de expresión de CD40, Ia-IE, B7.1, B7.2, B7-H1 and B7-DC en las DC de bazo entre ratones CD5^{-/-} y WT (**Fig. 7D**). Estos resultados indican que CD5 no está involucrado en el desarrollo de DC en condiciones homeostáticas

10.1.3 Papel de CD5 en la función de DC

Si bien CD5 no parece tener un papel en el desarrollo de las DC, podría estar involucrado en la función de las mismas. Para evaluar si CD5 afecta el

funcionamiento de las DC, se obtuvieron BMDC a partir de ratones WT y CD5^{-/-} y se estimularon por 24h con LPS para inducir su maduración, lo cual es medido por el aumento en la expresión de moléculas de MHC II (Ia/IE), moléculas co-estimuladoras (CD40, B7.1, B7-2) y de moléculas inhibitoras (B7-H1, B7-DC). Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de ninguna de las moléculas de superficie analizadas entre las células DC de ratones WT y CD5^{-/-} (**Fig. 10A**). Este efecto fue reproducido cuando se estimularon DC (CD11c⁺) purificadas de bazo con LPS por 24h (**Fig. 10B**), lo que sugiere que CD5 no afecta la expresión de moléculas importantes para la maduración y función de las células dendríticas.

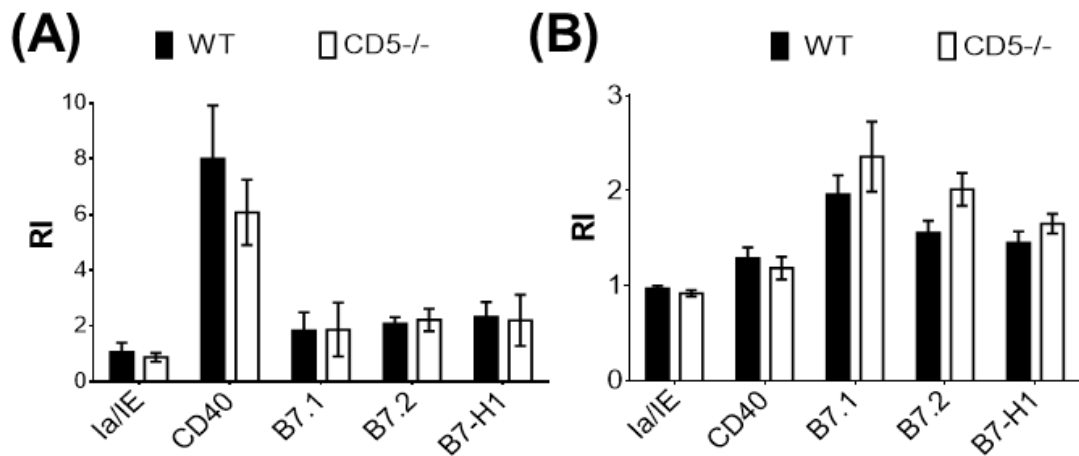


Figura 10. CD5 no afecta la expresión de moléculas co-estimuladoras ni co-inhibitorias tras la maduración de DC con LPS. (A) BM-DC y (E) CD11⁺ DC de bazo de ratones WT y CD5^{-/-} fueron estimulados con LPS por 24h, la expresión de Ia/IE, CD40, B7.1, B7.2 and B7-H1 fue analizada por citometría de flujo. La expresión está representada como un incremento relativo (IR) comparado con su contraparte no estimulada. Los datos representan promedio \pm EEM, n= 4 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

Para evaluar si CD5 tiene un papel en la secreción de citocinas por parte de las DC, BMDC WT y CD5^{-/-} fueron estimuladas por 24h con LPS, y a continuación se evaluó la expresión de mRNA de IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19, IL-6, IL-21, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-4 y TGF- β 1. Se observó un incremento significativo en la expresión de IL-12p40, IL-12p35 e IL-23p19 por parte de las BMDC CD5^{-/-} comparado con su contraparte WT (**Fig. 11A**). IL12p40 e IL-12p35 representan las dos subunidades de IL-12, mientras que IL-23p19, junto con IL-12p40, componen la IL-23 [141], Para comprobar si el efecto observado era reproducible en DC primarias, células CD11c⁺ de bazo fueron estimuladas con LPS por 24h y la expresión de IL-12 e IL-23 fue medida por medio de ELISA (**Fig. 11B**), mientras que TNF- α , INF γ , IL-6 e IL-10 fueron medidas por CBA. Los resultados mostraron un incremento significativo en la producción de IL-12 por parte de las DC CD5^{-/-} (400pg/mL) comparado con las DC WT (100pg/mL), pero no se observó una diferencia significativa en la producción de IL-23 (**Fig. 11B**). Al igual que con las BMDC, no se observaron diferencias en la producción de TNF α , INF γ , IL-6 ni IL-10 (**Fig. 11C**). Estos resultados sugieren que, si bien CD5 no tiene un efecto en el desarrollo de las DC en homeostasis, ni modula la expresión de marcadores de superficie en condiciones basales o tras la activación de las DC, si regula la producción de IL-12 por parte de las DC.

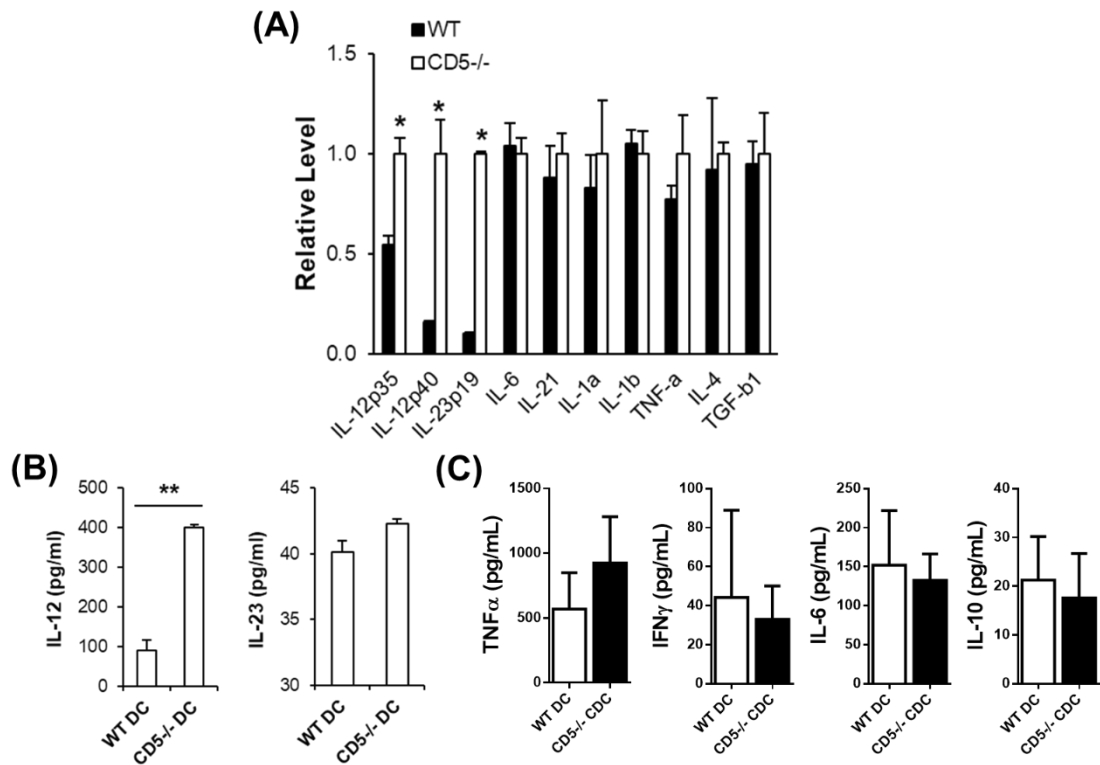


Figura 11. CD5 modula la producción de IL-12 por las DC.(A) BMDC WT y CD5^{-/-} fueron estimuladas 24h con LPS. Los niveles de expresión de citocinas fueron medidos por PCR en tiempo real. (n=4) (B) Células CD11c⁺ de bazo WT y CD5^{-/-} fueron estimuladas con LPS por 24h y las concentraciones de IL-12 e IL-23 fueron medidas en los sobrenadantes del cultivo por ELISA (n=3) (C) Células CD11c⁺ de bazo WT y CD5^{-/-} fueron estimuladas con LPS por 24h y las concentraciones de TNFα, INFγ, IL-6 e IL-10 fueron medidas en los sobrenadantes del cultivo por CBA (n=3). Los datos representan promedio ± EEM, n= 3 o 4 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

10.1.4 CD5 modula la capacidad de las DC de estimular células T y de inducir respuestas inmunes.

El papel de CD5 en la regulación de la activación y diferenciación de las células T ha sido ampliamente estudiado [94, 112, 113, 115]. Sin embargo, se desconoce si la expresión de CD5 en las DC juega un papel en la activación y diferenciación funcional de las células T.

Para evaluar si la expresión de CD5 tiene un efecto en la activación de las células T, BMDC WT y CD5^{-/-} fueron estimuladas con péptido OVA específico para MHC I o MHC II y co-cultivadas con células T OT-I (CD8⁺) o OT-II (CD4⁺), respectivamente. Los resultados mostraron que las BMDC CD5^{-/-} inducen una mayor proliferación de las células T que las BMDC WT, independientemente de si son linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ (**Fig. 12A y B**). Al igual que en los ensayos anteriores, para demostrar que este efecto es reproducible en DC primarias, células CD11c⁺ WT o CD5^{-/-} purificadas de bazo fueron estimuladas con péptido MOG₃₅₋₅₅ y co-cultivadas con células T CD4⁺ 2D2. Al igual que lo observado con las BMDC, las DC purificadas CD11c⁺ CD5^{-/-} inducen una mayor proliferación de las células T que sus contrapartes WT (**Fig. 12C**).

Para evaluar si CD5 modula la capacidad de las DC de activar a las células T *in vivo*, se transfirieron BMDC WT o CD5^{-/-} previamente estimuladas con péptido OVA a ratones WT vírgenes por medio de una inyección subcutánea en el cojinete plantar y posteriormente se transfirieron células OT-II u OT-I marcadas con CFSE por medio de una inyección intravenosa. 4 días después de la transferencia de , los ganglios drenantes (poplíteos) fueron colectados y se evaluó la proliferación las células transferidas. Se observó una mayor proliferación de las células OT-II u OT-I en los ratones que recibieron la transferencia de BMDC CD5^{-/-} que en aquellos que recibieron la transferencia de BMDC WT (**Fig. 12D**), recapitulando los resultados obtenidos *in vitro*. En conjunto, estos datos demuestran que CD5 disminuye la capacidad de las DC para inducir la activación y proliferación de las células T.

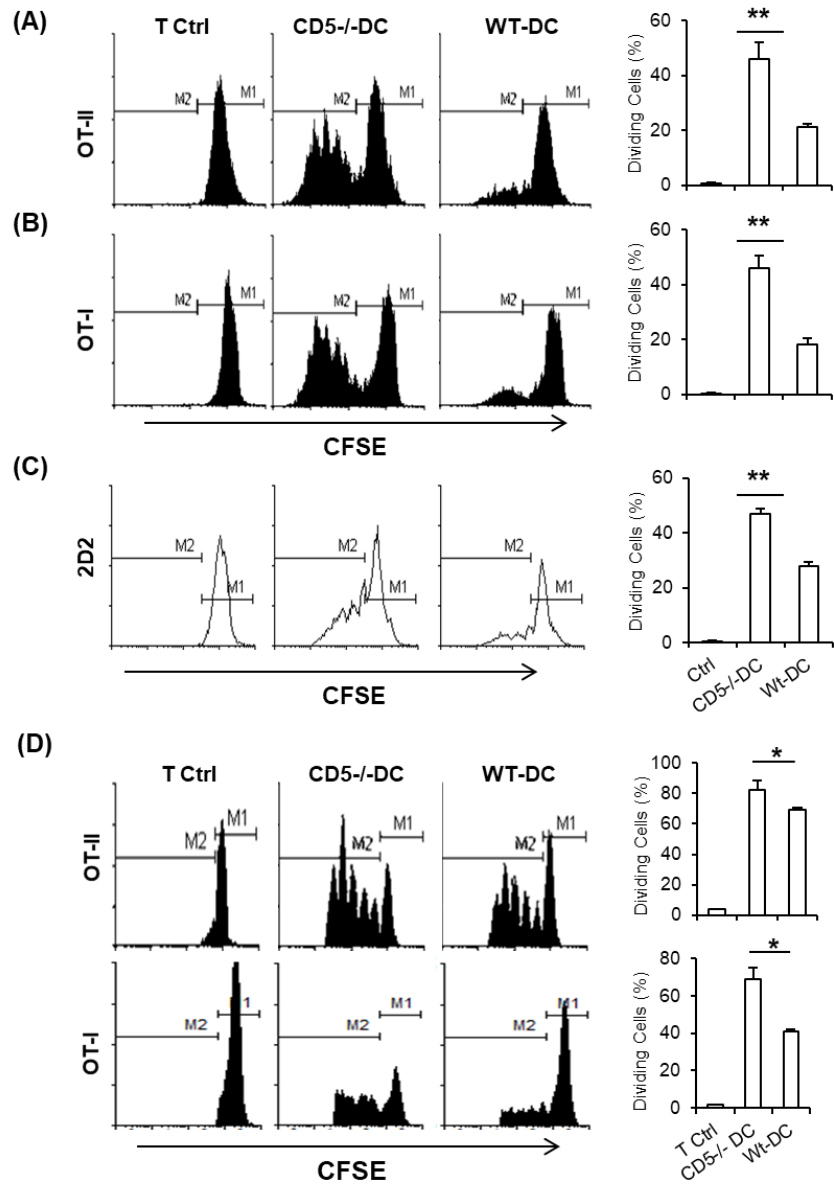


Figura 12. La ausencia de CD5 incrementa la capacidad de las DC de activar células T CD4+ y CD8+.

Células T OT-II (A) u OT-I (B) fueron co-cultivadas con BMDC WT o CD5^{-/-} estimuladas con péptidos OVA por 4 días y se evaluó la proliferación de las células T. (C) Células T CD4⁺ de ratones 2D2 fueron co-cultivadas con Células CD11c⁺ WT o CD5^{-/-} purificadas de bazo en presencia de péptido MOG₃₅₋₅₅ por 4 días y se evaluó la proliferación de las células T. (A-C) Cultivos sin la presencia del péptido fueron usados como control. (D) Ratones vírgenes fueron inyectados subcutáneamente con BMDC WT o CD5^{-/-}, previamente estimuladas con péptido OVA, seguido por una inyección intravenosa de células OT-II u OT-I CFSE⁺. Los ganglios poplíteos fueron analizados para evaluar la proliferación de las células T 4 días después. Ratones que solo recibieron la transferencia de células T pero no BMDC fueron usados como control. Los datos representan promedio \pm EEM, n = 5 o 6 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

La ausencia de CD5 induce una mayor expresión de IL-12 por las DC, citocina fundamental y necesaria para la diferenciación de células T vírgenes hacia un fenotipo Th1 [141]. Por ello, nos preguntamos si CD5 tendría un papel en la diferenciación de células T CD4+ hacia un fenotipo Th1. Para evaluar esto, células T OT-II fueron co-cultivadas con BMDC WT o CD5-/- estimuladas con péptido OVA y se evaluó la producción de citocinas IL-2, INF- γ e IL-17 por medio de ELISA. Los resultados muestran que hay una mayor producción de IL-2 e INF- γ por las células T en los cultivos con BMDC CD5-/- que en aquellos con BMDC WT (**Fig. 13A**). Para evaluar si había una mayor producción de citocinas por célula o un mayor porcentaje de células productoras de citocinas, se co-cultivaron células T OT-II con células CD11c+ WT o CD5-/- en presencia de péptido OVA. Al igual que en los cultivos con BMDC, se observó un incremento en el porcentaje de células productoras de IL-2 e INF- γ , pero no así en el porcentaje de células productoras de IL-17 ni IL-4, en los cultivos con células DC CD11c+ CD5-/- (**Fig 11B**). Estos resultados sugieren que CD5 regula la diferenciación de células T hacia un fenotipo tipo Th1 por medio de la regulación de la expresión de IL-12 por las células DC.

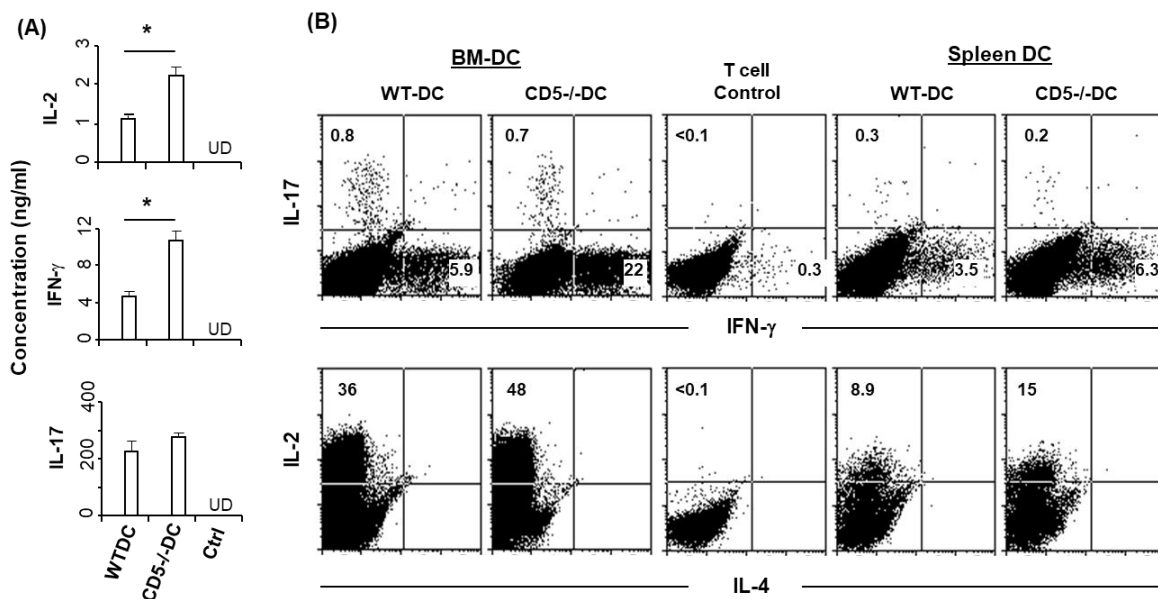


Figura 13. La ausencia de CD5 incrementa la capacidad de las DC de inducir la producción de citocinas tipo Th1 por células T. (A) BMDC WT o CD5^{-/-} fueron co-cultivadas con células T OT-II en presencia de péptido OVA, tras 4 días de cultivo los sobrenadantes fueron colectados, la concentración de citocinas fue determinada por ELISA. UD=No detectable. Los datos representan promedio \pm EEM, n= 4 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas (B) Células CD11c⁺ de bazo o BMDC WT o CD5^{-/-} fueron estimuladas con péptido OVA y co-cultivadas con Células T OT-II, el porcentaje de células productoras de citocinas fue determinada por citometría de flujo 4 días después. Los datos son representativos de 2-3 experimentos independientes.

10.1.5 CD5 modula la respuesta antitumoral.

La respuesta antitumoral está mediada principalmente por células T CD4⁺ Th1 y T CD8⁺ [142, 143]. Para evaluar si la mayor proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ así como el incremento en la producción de citocinas tipo Th1 inducidas por las células DC CD5^{-/-} tiene un efecto funcional *in vivo*, se transfirieron por medio de una inyección subcutánea, BMDC WT o CD5^{-/-} estimuladas con OVA a ratones vírgenes. A estos ratones, posteriormente se les inoculó la línea tumoral EG.7 (células EL4 transfectadas con el gen OVA). Los resultados mostraron que el

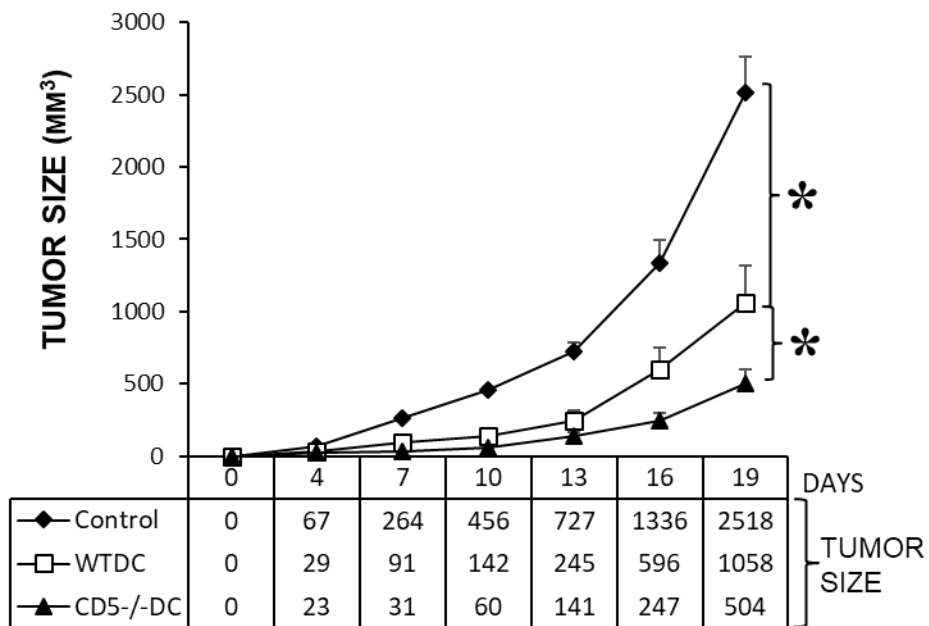


Figura 14. CD5-/- DC son más potentes en la inducción de respuestas antitumorales.

Ratones WT fueron inmunizados subcutáneamente con BMDC WT o CD5-/- estimuladas con OVA y posteriormente fueron inoculados subcutáneamente con la línea tumoral murina EG.7. El tamaño del tumor fue medido cada 3 días. Ratones no inmunizados fueron usados como control. Los datos representan promedio \pm EEM, n= 5 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

tamaño del tumor en aquellos ratones inmunizados con BMDC CD5-/- era significativamente menor que el de aquellos inmunizados con BMDC WT (**Fig. 14**). Estos resultados sugieren un papel regulador de CD5 en la capacidad de las DC para activar y modular las respuestas inmunes; además, abre la posibilidad de usar el bloqueo de las señales de CD5 para incrementar las respuestas antitumorales.

10.1.6 CD5 regula respuestas de tipo hipersensibilidad por contacto

Otro tipo de respuesta mediada por células Th1 y CD8+ y en la cual la presencia de INF γ es importante, es la respuesta de hipersensibilidad por contacto, un tipo de hipersensibilidad retardada [144-146]. Para corroborar el efecto de CD5 en la modulación de las respuestas Th1 y en la activación de células T CD4+ y CD8+, se transfirieron células CD11c+ purificadas de bazo WT o CD5 $^{-/-}$, previamente sensibilizadas con el hapteno DNBS, a ratones vírgenes, los cuales fueron posteriormente estimulados con DNFB para inducir una respuesta de hipersensibilidad por contacto, la cual fue evaluada por medio de la medición de la inflamación presente en la oreja de dichos ratones (sitio de estímulo). Los resultados demostraron una mayor inflamación y, por lo tanto, una mayor respuesta de hipersensibilidad, en aquellos ratones a los cuales se transfirieron DC CD5 $^{-/-}$ que aquellos que recibieron DC WT (**Fig. 15A, panel derecho**). De manera similar, la transferencia de BMDC CD5 $^{-/-}$ sensibilizadas con hapteno, induce una mayor hipersensibilidad que las BMDC WT (**Fig. 15A, panel izquierdo**).

Adicionalmente, se aislaron células T de los ganglios drenantes de ratones que habían recibido la transferencia de células CD11c+ CD5 $^{-/-}$ o WT sensibilizadas con hapteno. Las células T fueron posteriormente co-cultivadas con BMDC WT estimuladas con hapteno. Se observó que las células T aisladas de ratones que habían recibido la transferencia de DC CD5 $^{-/-}$ producían niveles mayores de INF γ e IL-2, no así de IL-17, esto comparado con aquellas células T aisladas de ratones que habían recibido DC WT (**Fig. 15B**).

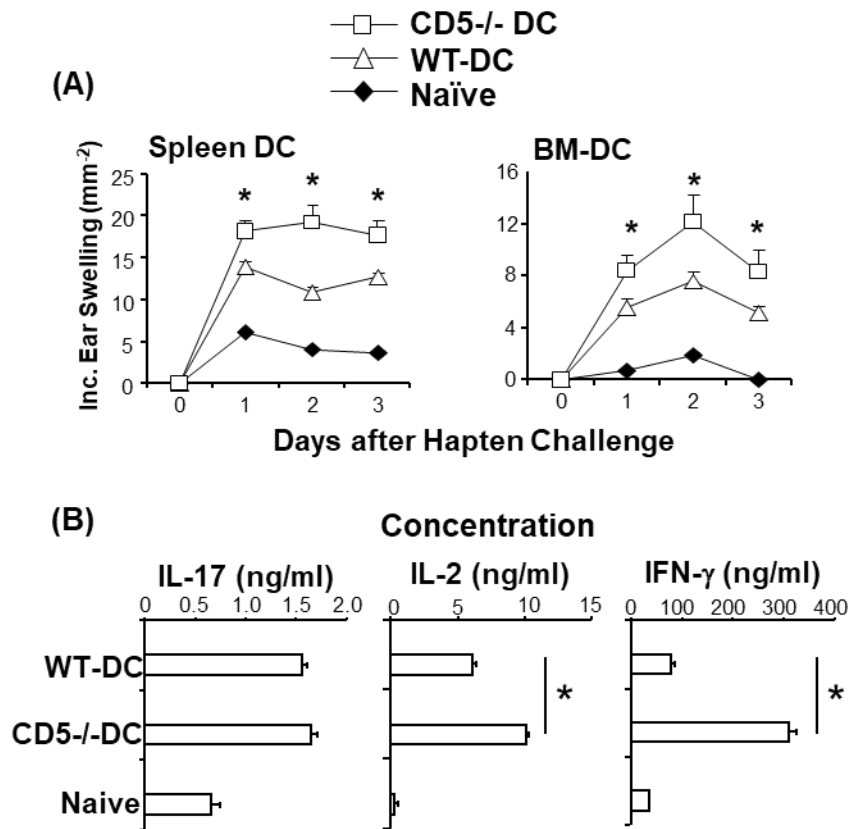


Figura 15. La ausencia de CD5 incrementa las respuestas de hipersensibilidad por contacto.

Células CD11c⁺ de bazo o BMDC de ratones WT o CD5^{-/-} fueron sensibilizadas con DNBS e inyectadas subcutáneamente a ratones vírgenes. (A) Los ratones receptores fueron estimulados con DNFB en la oreja y la inflamación fue medida. Ratones que no recibieron DC estimulados con DNFB fueron usados como control (n=5) (B) Células T de los ganglios drenantes fueron aisladas de los ratones receptores y co-cultivadas con BMDC WT estimuladas con DNFB. La producción de citocinas fue medida por ELISA. Como control se usaron células T de ratones vírgenes (n=2-3). Los datos representan promedio \pm EEM. Prueba t de Student de dos colas.

10.1.7 La re-expresión de CD5 en DC CD5^{-/-} restablece su capacidad normal de activar las células .

En los ratones CD5^{-/-} durante ninguna etapa del desarrollo y en ninguna línea celular se expresa CD5. Para excluir que el efecto observado en las células DC se debiera a un cambio no reconocido en el desarrollo de las DC o a un cambio mediado por otra célula, la expresión de CD5 fue restablecida en las BMDC CD5^{-/-}

por medio de un adenovirus que codifica CD5 (Ad-CD5); como control, se utilizó el mismo adenovirus pero que codifica para GFP (Ad-GFP). La infección con Ad-CD5 restaura exitosamente la expresión de CD5 en las BMDC CD5^{-/-}, inclusive a niveles mayores que los expresados endógenamente por las BMDC WT. Las BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-GFP no expresan CD5, validando de esta manera el sistema (**Fig 16A**). La producción de citocinas fue evaluada por medio de ELISA, de manera concordante con la que se había reportado por mRNA (**Fig. 11A**), las BMDC CD5^{-/-} producen niveles más altos de IL-12 e IL-23 comparado con las BMDC WT (**Fig. 16B**). La restauración de la expresión de CD5 en las BMDC CD5^{-/-} redujo significativamente la capacidad de producción de IL-12 e IL-23, a niveles inclusive menores que aquellos producidos por las células BMDC WT (**Fig. 16B**), la infección con Ad-GFP no produjo ningún efecto en la producción citocinas y sus niveles fueron comparables con aquellos producidos por las BMDC CD5^{-/-}.

Para evaluar si la re-expresión de CD5 también era capaz de restaurar su capacidad de activar células T e inducir respuestas inmunes, BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 o Ad-GFP fueron estimuladas con OVA y co-cultivadas con células T OT-I u OT-II; los resultados demostraron que las BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 inducen la proliferación de células OT-I y OT-II en la misma magnitud que las BMDC WT, mientras que las BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-GFP mantienen su capacidad de inducir una mayor proliferación de las células T, a niveles comparables con los de BMDC CD5^{-/-} (**Fig. 16C**).

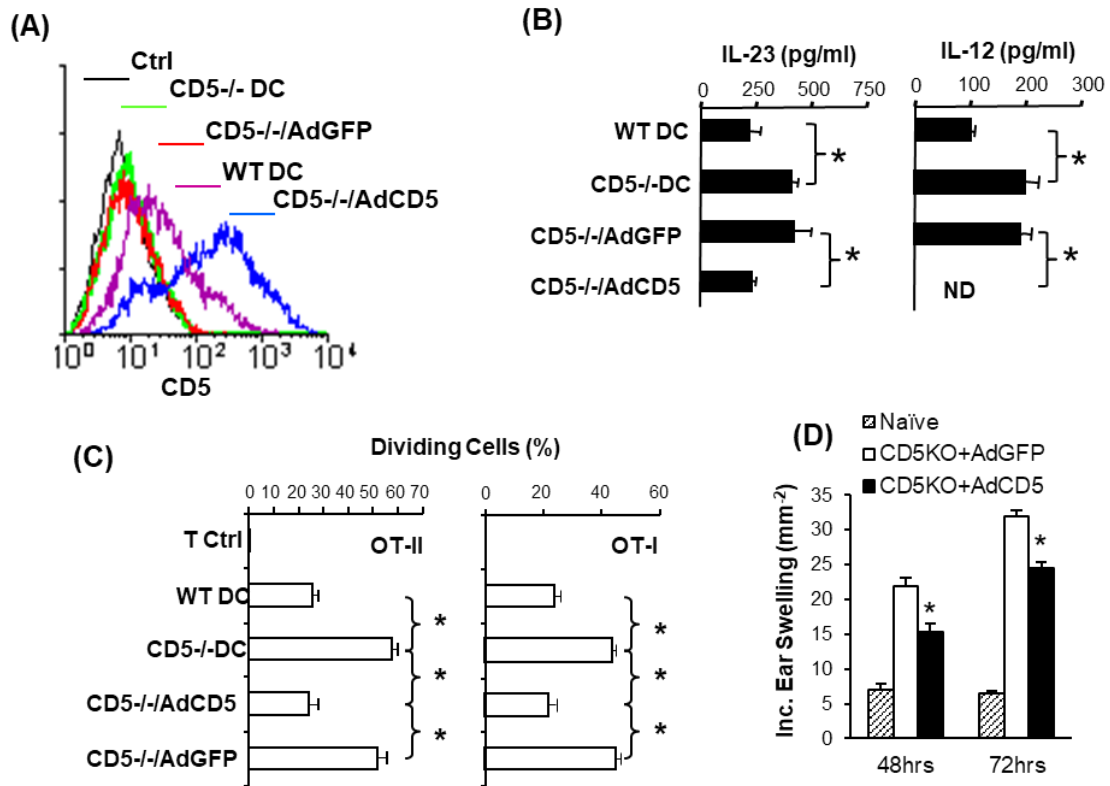


Figura 16. La re-expresión de CD5 en DC CD5^{-/-} restaura su capacidad de inducir respuesta inmunes.

(A) BMDC CD5^{-/-} fueron infectadas con adenovirus Ad-CD5 (CD5^{-/-}/Ad-CD5) o Ad-GFP (CD5^{-/-}/Ad-GFP), Ctrl = Control de isotipo. (B) BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 o Ad-GFP fueron estimuladas con LPS por 24h, la producción de citocinas fue evaluada por ELISA. UD= No detectable (n=4). (C) BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 o Ad-GFP fueron estimuladas con péptido OVA, co-cultivadas con células OT-I u OT-II por 4 días, la proliferación de las células T fue determinada por citometría de flujo. T Ctrl = Células T solas (n=4) (D) BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 o Ad-GFP fueron estimuladas con DNBS, se inyectaron en ratones vírgenes, los cuales posteriormente fueron estimulados con DNFS, la respuesta de hipersensibilidad fue evaluada por medio de la inflamación en la oreja (n=6). Los datos representan promedio ± EEM. Prueba t de Student a dos colas.

Finalmente, para determinar si el efecto observado por la restauración de la expresión de CD5 también impactaba su capacidad de modular respuestas inmunes, BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-GFP o Ad-CD5 fueron estimuladas con el hapteno DNBS e inyectadas subcutáneamente a ratones vírgenes. Los resultados muestran que las BMDC CD5^{-/-} infectadas con Ad-CD5 inducen una menor

respuesta de hipersensibilidad que aquellas infectadas con Ad-GFP (**Fig. 16D**). En conjunto, estos resultados demuestran que la restauración de la expresión de CD5 limita la capacidad de las DC CD5^{-/-} de producir IL-12 e IL-23, regulando la activación de células T y la generación de respuestas tipo Th1.

10.1.8 Papel de las DC CD5^{-/-} en la generación de Tregs

Las DC son fundamentales para desarrollar una respuesta inmune efectora, sin embargo, también son fundamentales para mantener la tolerancia inmunológica y en la resolución de las respuestas iniciadas para controlar la inflamación exacerbada y alcanzar la homeostasis inmunológica. Se ha observado que las DC inmaduras en homeostasis o aquellas generadas en ambientes no inflamatorios pueden propiciar la generación de Tregs [147]. Por otro lado, para la generación de Tregs, la intensidad de las señales del TCR son importantes [124]. Como ya se ha mencionado anteriormente, CD5 actúa como un regulador negativo de dichas señales y participa en la generación de Tregs [111, 127]. Sin embargo, se desconoce si la expresión de CD5 en las DC puede modular la generación de células T reguladoras.

Los ratones CD5^{-/-} fueron cruzados con ratones Foxp3.GFP, los cuales co-expresan la proteína verde fluorescente (GFP) junto con Foxp3; de esta manera, las Tregs pueden ser identificadas por la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Para poder evaluar el efecto de la expresión de CD5 en DC en la generación de Tregs, se aislaron células T CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻ WT o CD5^{-/-} y fueron

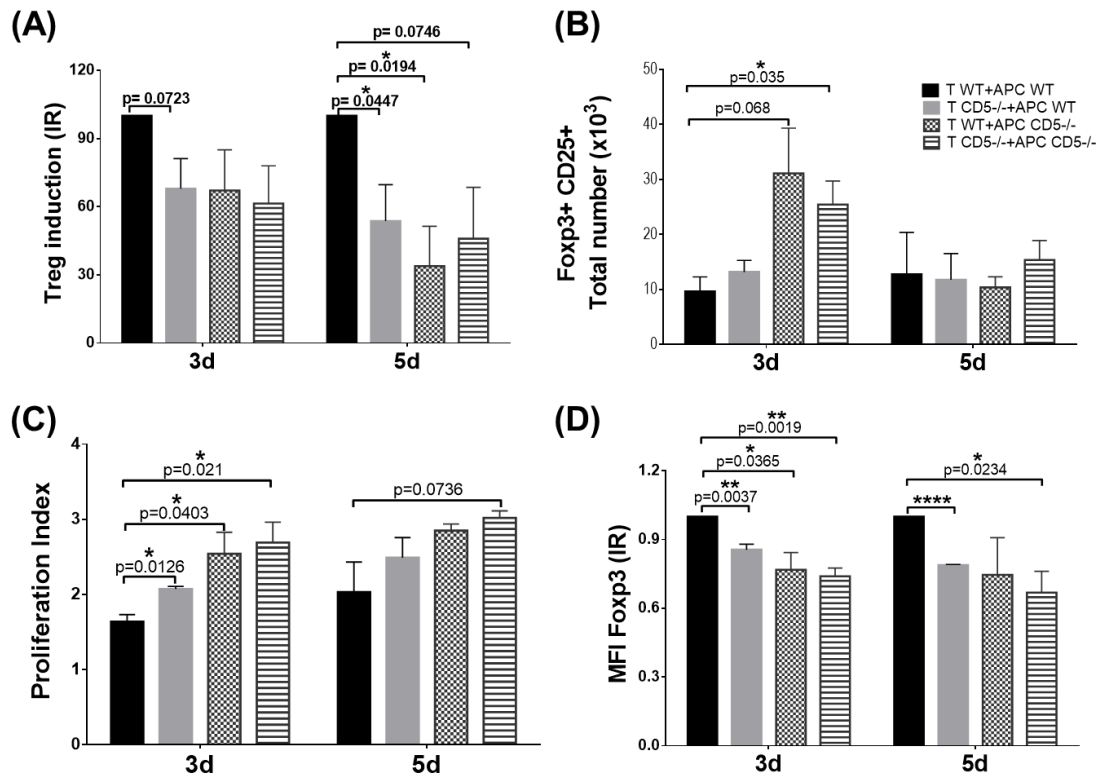


Figura 17. La ausencia de CD5 en las DC disminuye la capacidad de inducción de Tregs. Células T CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP- WT o CD5^{-/-} fueron co-cultivadas con células CD11c⁺ WT o CD5^{-/-} de bazo en presencia de anti-CD3 y TGFβ por 3 y 5 días. (A) Generación de Tregs a los 3 y 5 días de cultivo, los datos están normalizados, considerando un 100% de inducción aquella obtenida en los cultivos con células T WT y CD11c⁺ WT. (B) Números totales de las Tregs generadas tras 3 y 5 días de cultivo. (C) Índice de Proliferación de las Tregs generadas tras 3 y 5 días de cultivo (D) Expresión de Foxp3 en las Tregs generadas tras 3 y 5 días de cultivo, los resultados están normalizados, considerando como 1 la expresión de Foxp3 de las Tregs generadas en los cultivos con células T WT y CD11c⁺ WT. Los datos representan promedio ± EEM de 3 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

co-cultivadas con células CD11c⁺ de bazo WT o CD5^{-/-} en una proporción 1:1 en presencia de TGFβ para inducir la generación de Tregs. Los resultados mostraron que al igual que lo previamente reportado, en presencia de DC WT [127], las células T CD5^{-/-} presentan una menor capacidad de generar Tregs que las células T WT. Al evaluar el efecto que tiene la ausencia de CD5 en las DC, se observó que, aún con células T WT las DC CD5^{-/-} inducen una menor generación de Tregs que las

DC WT. De manera interesante, el cultivo de ambas células (DC y linfocitos T) deficientes de CD5 no indujo menor generación de Tregs que la presencia de una sola población deficiente (células T CD5^{-/-} o DC CD5^{-/-}), sugiriendo que no es un efecto sinérgico (**Fig. 17A**).

De manera notable, al evaluar los números totales en los cultivos se observó que a pesar de haber una disminución en el porcentaje de Tregs se presentaba un incremento en los números totales de esta población en los cultivos que contenían DC CD5^{-/-}, sobre todo a tiempos tempranos (3 días de cultivo, **Fig. 17B**). Al evaluar la proliferación de las Tregs generadas en cultivo, se observó que, consistente con lo ya reportado en timocitos [95], las células T CD5^{-/-} hiperproliferan tras la activación, y al igual que lo reportado en este trabajo con las células T totales, la ausencia de CD5^{-/-} en las DC induce una mayor proliferación de las Tregs WT y CD5^{-/-} generadas. Al comparar la proliferación que induce una DC WT o CD5^{-/-} sobre las Treg CD5^{-/-}, observamos una proliferación ligeramente mayor en aquellas generadas en presencia de DC CD5^{-/-} (**Fig. 17C**). Finalmente, se evaluó la expresión de Foxp3 en las Treg generadas y los resultados indican que la ausencia de CD5 ya sea en la célula T o en la DC induce una menor expresión de Foxp3 (**Fig. 17D**). Estos resultados demuestran que CD5 no solo regula la capacidad de las DC para activar las células T e inducir respuestas Th1, si no que también regula la capacidad de estas células para inducir Tregs.

10.2 Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la generación y función de las células T reguladoras

10.2.1 Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la generación de Tregs en homeostasis

El papel de CD5 en la generación de Tregs, tanto tímicas como inducidas, ha sido previamente descrito. En ausencia de CD5 se presenta un incremento en porcentaje y números totales de las tTregs [111]. Por otra parte, se ha observado que las Tregs CD5^{-/-} presentan una menor capacidad supresora [125] y que la expresión de CD5 correlaciona con la capacidad de las células T CD4⁺ CD25⁻ para convertirse hacia células T reguladoras [127]. Nuestros resultados utilizando ratones CD5^{-/-} corroboraron los datos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación [111] en donde se observó un incremento en el porcentaje de Tregs en timo, adicionalmente se observó una ligera disminución en el porcentaje de Tregs en ganglios linfáticos (**Fig. 18A**). Adicionalmente al analizar el porcentaje de tTregs (Helios⁺) y pTregs (Helios⁻) se observó que en ausencia de CD5 un incremento de tTregs en timo pero no en órganos linfoides periféricos (**Fig. 18B**). De manera interesante, se observa una disminución de las pTregs en ganglio y bazo (**Fig. 18C**) lo cual concuerda con lo reportado por Henderson et al., en donde se observa una disminución de las células Foxp3⁺Nrp1^{lo} (pTregs) pero no así en las células Foxp3⁺Nrp1^{hi} (tTregs) en lamina propia de ratones CD5^{-/-} [127]. Finalmente, concordante con lo ya reportado, se observó que las células CD4⁺CD25⁻ provenientes de ratones CD5^{-/-} presentan una menor susceptibilidad a diferenciarse hacia células Tregs (**Fig. 18D**).

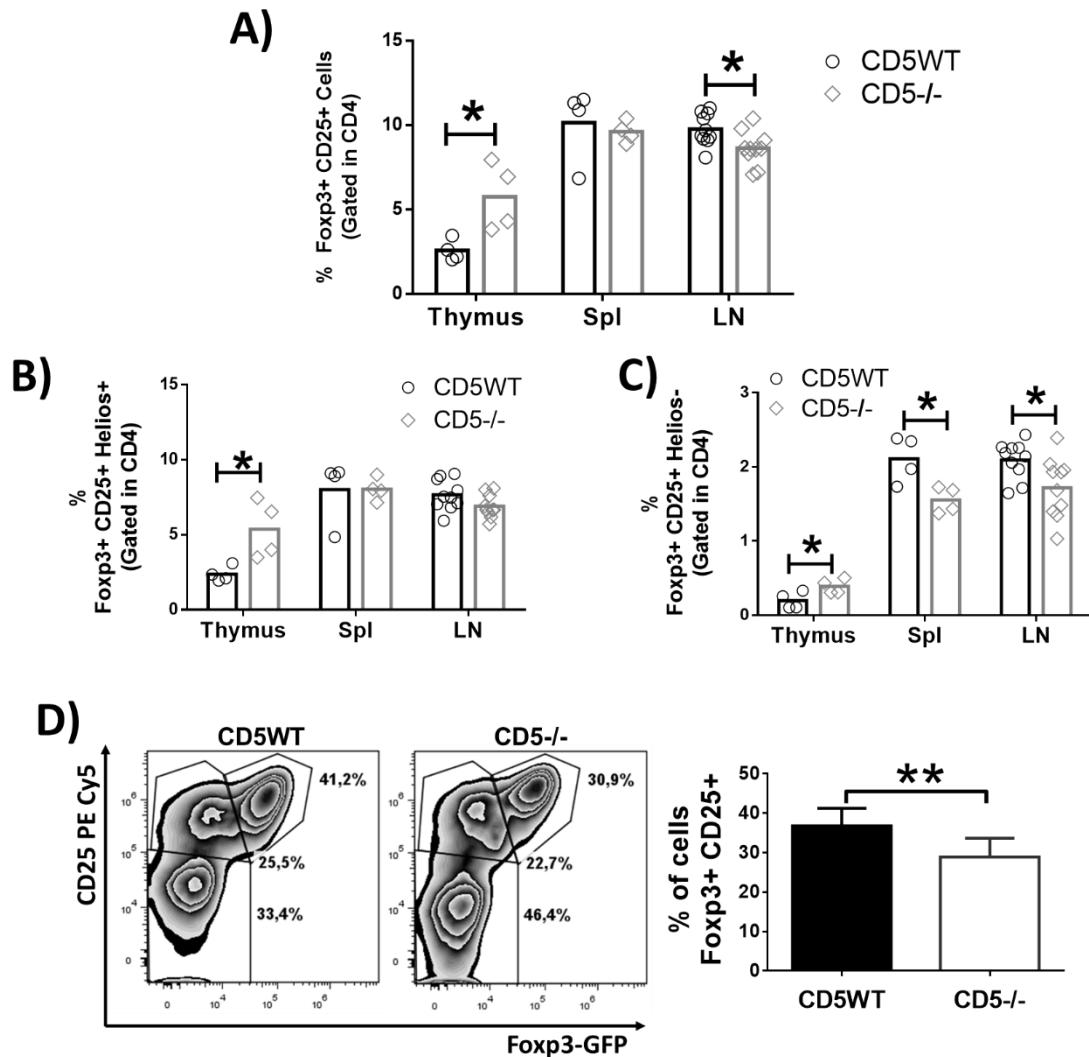


Figura 18. La ausencia CD5 favorece la generación de tTregs y disminuye la generación de pTregs. Células de timo, bazo y ganglios periféricos fueron obtenidos de ratones CD5WT o CD5^{-/-}, se evaluaron las subpoblaciones de Tregs. Porcentajes de las poblaciones (A) Foxp3+ CD25 (B) tTregs (Helios+) y (C) pTregs (Helios-). (D) Células T CD4+/CD25-/Foxp3.GFP- fueron obtenidas de bazo y ganglios periféricos de ratones WT o CD5^{-/-} y fueron estimulados en condiciones polarizantes hacia Tregs (anti-CD3 + anti-CD28 + rhTGF β) por 5 días. Dot plot representativo de la generación de Tregs en el que se grafica la expresión de Foxp3 versus la expresión de CD25 (Izq). Porcentaje de células Tregs generadas en cultivo (Der). Los datos representan promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes (n= 3-4 ratones por cepa). Prueba t de Student de dos colas.

Sin embargo, aún no se ha dilucidado si existe algún dominio funcional dentro de CD5 que esté involucrado en la modulación de la generación de Tregs. Estudios

recientes han reportado que el ratón deficiente del dominio de unión de CK2 a CD5 (CD5 Δ CK2) no presenta alteraciones en el porcentaje y números totales de tTregs [108]. Sin embargo, en este estudio no se hizo un análisis a profundidad de las poblaciones de Tregs, ni se analizaron las Tregs en periferia. Nuestro interés es evaluar si la ausencia del CD5-CK2BD es relevante para la generación de Tregs tímicas y periféricas en condiciones homeostáticas. Con este fin, se evaluó la expresión de Foxp3, el factor transcripcional maestro de las Tregs, así como Helios, un factor transcripcional que se ha utilizado para a distinguir a las tTregs (Helios+) de las pTregs (Helios-) [38] dentro de las células CD4+ de timo, bazo, ganglios periféricos y mesentéricos.

De acuerdo a lo reportado previamente, no se encontraron diferencias en el porcentaje ni números totales de la población CD4+/CD25+/Foxp3+ entre el ratón WT y CD5 Δ CK2 en el timo [108]; adicionalmente, tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje ni números totales de esta población en ninguno de los órganos analizados. Al realizar un análisis más detallado, se evaluaron las tTregs (Helios+) y pTregs (Helios-), los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en el porcentaje ni números totales de estas poblaciones entre el ratón WT y CD5 Δ CK2 (**Fig. 19B y C**).

Es de notar que, al analizar la expresión de CD5 en las Tregs, se observó que las Tregs (CD4+/CD25+/Foxp3+) del ratón CD5 Δ CK2 presentan niveles menores de expresión de CD5 en comparación con las Tregs WT, tanto en las tTregs como las

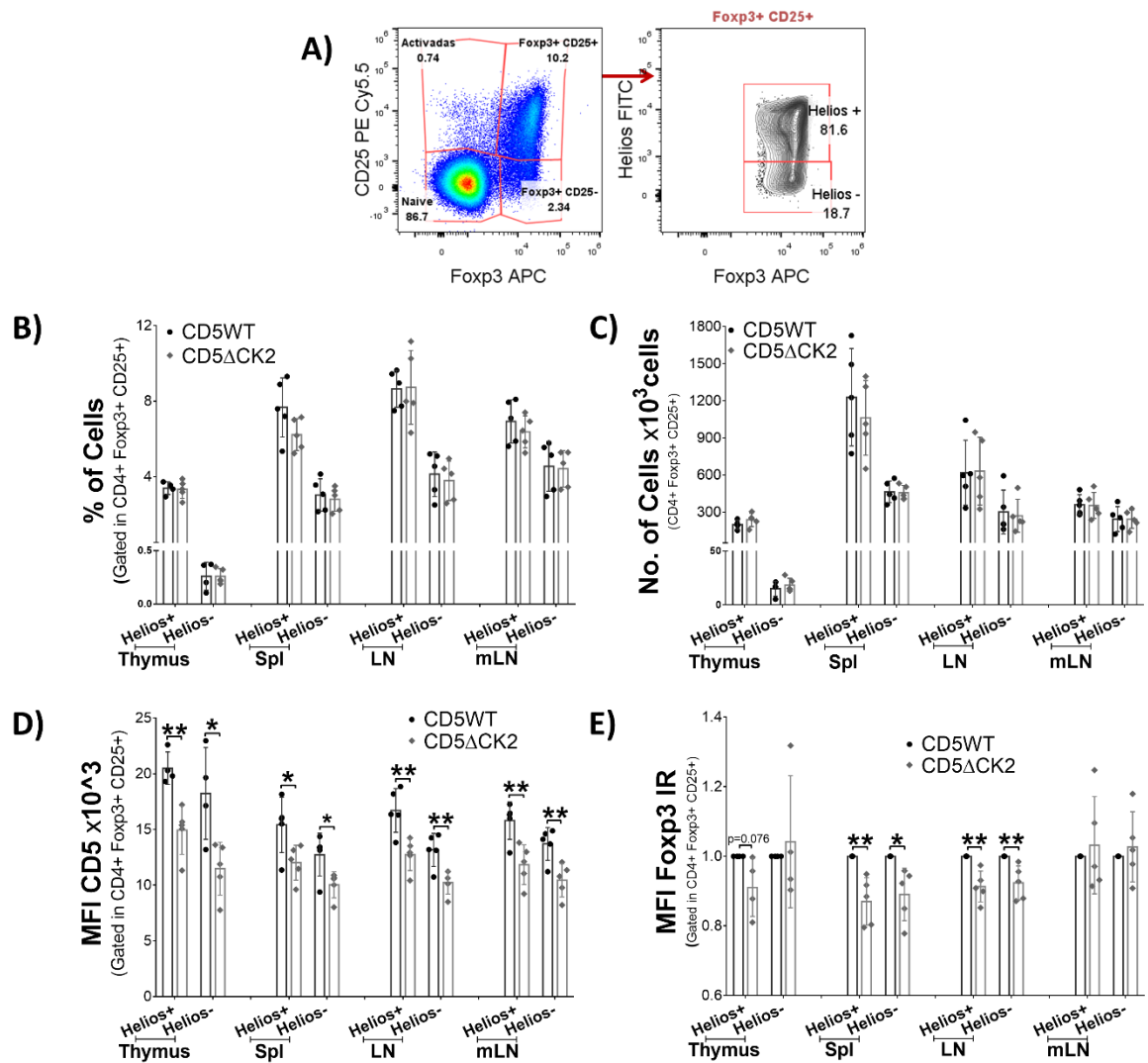


Figura 19. La ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 no afecta la generación de Tregs, pero promueve la expresión de CD5 y Foxp3. Células de timo, bazo y ganglios periféricos y mesentéricos fueron obtenidos de ratones CD5WT o CD5ΔCK2, se evaluaron las subpoblaciones de Tregs. (A) Estrategia de “gating” para la identificación de tTregs (Helios+) y pTregs (Helios-). (B) Porcentajes y (C) números totales de tTregs (CD4+/CD25+/Fopx3+/Helios+) y pTregs (CD4+/CD25+/Fopx3+/Helios-) en los órganos analizados. (D) Expresión de CD5 (Intensidad Media de Fluorescencia, MFI) en las subpoblaciones de Tregs analizadas. (E) Expresión de Foxp3 en las subpoblaciones de Tregs. La expresión está representada como un incremento relativo con respecto a la expresión observada en la población WT correspondiente. Los datos representan promedio ± EEM de 3 experimentos independientes (n= 3-4 ratones por cepa). Prueba t de Student de dos colas.

pTregs (**Fig. 19D**). Estos resultados podrían indicar que el dominio de unión de CK2 a CD5 podría estar involucrado en la regulación de la expresión de CD5.

Adicionalmente, se evaluó el nivel de expresión de Foxp3 en las Tregs. Los resultados muestran que, en ganglio y bazo las Tregs CD5 Δ CK2 presentan una menor expresión de Foxp3 que su contraparte WT, de manera similar a la expresión de CD5, la reducción en la expresión de Foxp3 se observa tanto en tTregs como en pTregs (**Fig. 19E**). Estos resultados sugieren que, si bien el CD5-CK2BD no parece tener un papel en la generación de Tregs, si podría afectar la funcionalidad de estas células, ya que ha sido ampliamente reportado que el nivel de expresión de Foxp3 es relevante para la capacidad supresora de las Tregs [148, 149].

10.2.2 Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la función de las células Treg

Para evaluar si la menor expresión de Foxp3 en las Tregs CD5 Δ CK2 tenía un efecto funcional, se generaron ratones doble transgénicos deficientes del CD5-CK2BD que expresaran la proteína GFP junto con Foxp3. Se purificaron células CD4⁺/CD25⁺/Foxp3.GFP⁺ WT o CD5 Δ CK2 y éstas fueron co-cultivadas con células T vírgenes (CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻/CD44^{lo}/CD62L^{hi}) estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 a diferentes concentraciones para inducir su proliferación.

Tras 96h de cultivo la proliferación de las células T fue medida por citometría de flujo. Los resultados demostraron que la ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 no afecta significativamente la capacidad supresora de las Tregs a pesar de presentar una menor expresión de Foxp3 (**Fig. 20**).

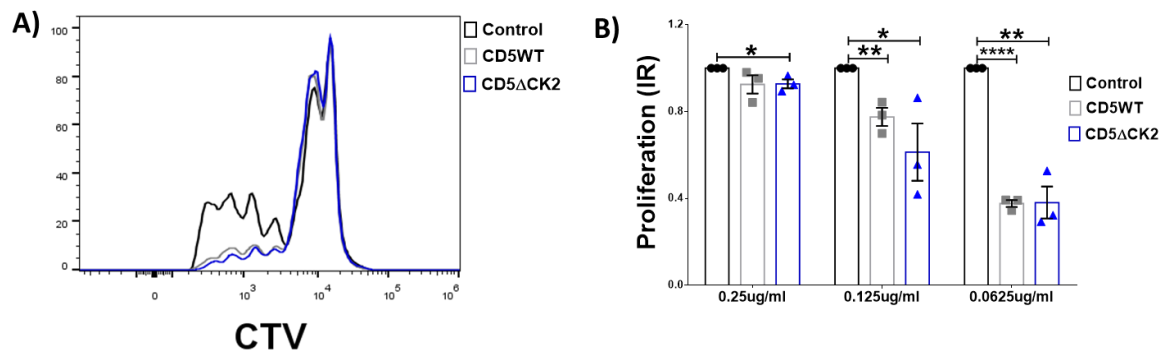


Figura 20. El dominio de unión de CK2 a CD5 no afecta la capacidad supresora de las Tregs. Células T vírgenes CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻/CD44^{lo}/CD62L^{hi} fueron activadas con anti-CD3 y anti-CD28 (0.0625, 0.125, 0.25 μg/ml) para inducir la proliferación y co-cultivadas con Tregs (CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺) CD5WT o CD5ΔCK2 en una proporción 2:1, por 4 días tras los cuales se evaluó la proliferación de las células. (A) Histogramas representativos de la proliferación de las células T. Control, células activadas en ausencia de Tregs (negro), con Treg CD5WT (gris) o CD5ΔCK2 (azul). (B) Proliferación de las células T, los resultados están normalizados tomando como 1 la proliferación obtenida en los cultivos sin Treg. Los datos representan promedio ± EEM de 3 experimentos independientes. Prueba t de Student de dos colas.

10.2.3 Papel de dominio de unión de CK2 a CD5 en la inducción de Tregs

Como ya se ha mencionado anteriormente la expresión de CD5 en las células T CD4⁺ favorece la inducción de Tregs, por un efecto al parecer mediado por la supresión de vía mTOR [127]. Sin embargo, aún no se ha evaluado si existe algún dominio funcional de CD5 responsable de este efecto. En este contexto, se ha observado que el CD5-CK2BD tiene un papel en la diferenciación hacia los fenotipos Th2 y Th17 [112, 113]. De igual manera, ha sido reportado que la inhibición de CK2 en células T CD4⁺ promueve la generación de Tregs y disminuye la diferenciación hacia Th17 [130-132]. A partir de estos resultados, surgió la hipótesis de que el CD5-CK2BD pudiera participar en el papel de CD5 en la inducción de Tregs.

Para evaluar si la señalización mediada por CK2 asociado a CD5 tenía un efecto en la generación de Tregs, células T CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻ fueron purificadas a partir de bazo y ganglios de ratones WT o CD5 Δ CK2 y estimuladas con concentraciones subóptimas de anti-CD3 (1 μ g/ml) y anti-CD28 (2 μ g/ml) en presencia de rhTGF β . Contrario a lo observado en ausencia de CD5, las células T CD5 Δ CK2 son más susceptibles a convertirse a Tregs que aquellas WT (**Fig. 21A y B**).

Los resultados también muestran que las Tregs generadas a partir de ratones CD5 Δ CK2 presentan una mayor expresión de Foxp3 (**Fig. 21C**), pero no presentan diferencias en la expresión de CD25 (**Fig. 21D**) comparado con aquellas inducidas a partir de ratones WT. Adicionalmente, las Tregs CD5 Δ CK2 presentan menores niveles de expresión de CD5 (**Fig. 21E**) consistente con lo observado en las Tregs en condiciones homeostáticas. Al evaluar la proliferación de las Tregs generadas se observa que las Tregs CD5 Δ CK2 presentan una menor proliferación que las Tregs WT (**Fig. 18F**) lo cual concuerda con reportes previos que demostraron que las células T CD4⁺ CD5 Δ CK2 hipoproliferan [113]. Estos resultados sugieren que el CD5-CK2CD tiene un papel funcional en la generación de novo de Tregs en periferia o en la supervivencia de estas células.

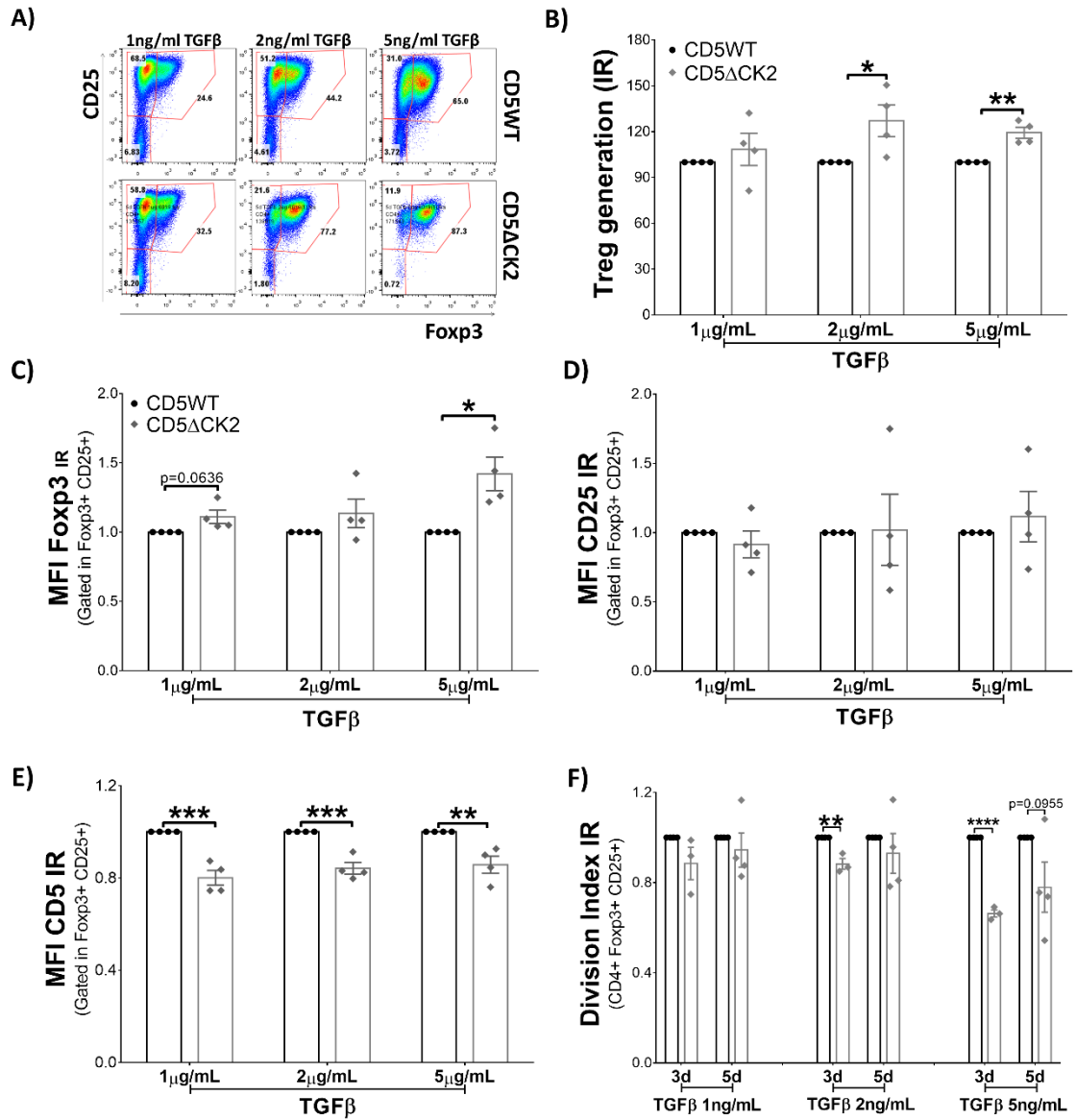


Figura 21. El dominio de unión de CK2 a CD5 regula la generación de iTregs, la expresión de Foxp3 y promueve la proliferación de las iTregs. Células T CD4⁺/CD25⁻/Foxp3.GFP⁻ fueron obtenidas de bazo y ganglios periféricos de ratones WT o CD5ΔCK2 y fueron estimulados en condiciones polarizantes hacia Tregs (anti-CD3 + anti-CD28 + rhTGFβ) por 5 días. (A) Dot plot representativo de la generación de Tregs en el que se grafica la expresión de Foxp3 versus la expresión de CD25. Datos representativos de 4 experimentos independientes. (B) Generación de Tregs. Los datos están normalizados a la generación de Tregs obtenida de los cultivos con células WT de cada experimento. Expresión de Foxp3 (C), CD25 (D) y CD5 (E). (F) Índice de división de las Tregs generadas en cultivo a 3 y 5 días de cultivo. Los resultados están fueron normalizados respecto a la proliferación obtenida en los cultivos WT. Los datos representan promedio ± EEM de 3 experimentos independientes (n= 3-4 ratones por cepa). Prueba t de Student de dos colas.

10.3 Resumen de los resultados

Papel de CD5 en la DC	<p>No afecta se generación en condiciones homeostáticas</p> <p>No afecta la expresión de marcadores de superficie en condiciones homeostáticas ni tras la activación</p> <p>Inhibe la producción de IL-12</p>
Papel de CD5 en la respuesta inmune mediada por DCs	<p>Inhibe la proliferación de células T CD4+ y T CD8+</p> <p>Inhibe la producción de IL-2 e IFNY por las células T</p> <p>Disminuye la respuesta antitumoral y de hipersensibilidad mediada por contacto</p> <p>Favorece la generación de iTregs</p>
Papel de dominio de unión de CK2 a CD5 en las células Tregs	<p>No afecta la generación de tTregs ni pTregs en condiciones homeostáticas.</p> <p>No afecta la capacidad supresora de las Tregs</p> <p>Inhibe la generación de iTregs, así como la expresión de Foxp3 en las mismas</p>

11 DISCUSIÓN

11.1 La expresión de CD5 en DC y su papel en la regulación de respuestas inmunes

Se ha demostrado que CD5 juega un rol importante en la regulación negativa de las señales del TCR, en el desarrollo de células T, así como en su supervivencia y diferenciación de estas (revisado en [140]).

La expresión de CD5 en otras células del sistema inmune, mas allá de los linfocitos, ha sido muy poco estudiada. Anteriormente, había sido reportado que en rata y humanos se podía observar la expresión de mRNA de CD5 en DC [150, 151]. Recientemente fue reportado que en humano, las DC presentes en ganglios y amígdalas expresan CD5; en este trabajo también se reportó que las DC convencionales tipo 2 (HLA-DR+/CD11c+/CD1c+) presentes en sangre puede subdividirse en base a su expresión de CD5, en CD5^{hi} (alta expresión) y CD5^{lo} (baja expresión) [79]. Otros reportes demostraron que en humano las células pDC, las células epidermales de Langerhans (CD1a^{hi}/Langerina+) y las DC dermales (HLA-DR+/CD1a^{dim}) también expresan CD5 [80, 81]. Sin embargo, en estos estudios no fue determinado si CD5 tiene un efecto biológicamente relevante o solo funciona como un marcador para identificar las diferentes poblaciones de DC.

Nuestros resultados demuestran que CD5 está expresado ubicuamente en las células DC Lin-/CD11c+/IaIE+ presentes tanto en órganos linfoides como no linfoides (piel y el pulmón) de ratón. Dentro de las DC encontradas en órganos linfoides, tanto aquellas células residentes como las migratorias expresan CD5,

éstas últimas presentando una menor expresión. De igual manera, las DC presentes en órganos no linfoides (piel y pulmón) expresan niveles menores de CD5, lo cual sugiere que las células residentes de tejido pudieran ser identificadas por su menor expresión de CD5. El análisis de DC en pulmón puede resultar complicado ya que los macrófagos alveolares expresan altos niveles de CD11c y son autofluorescentes, por lo que pueden ser fácilmente confundidos con DC [152]; por ello, para poder discriminar entre macrófagos y DC en pulmón se utilizó el marcador F4/80, demostrando de esta manera que las células DC presentes en este órgano expresan CD5. Los resultados también demuestran que las BMDC expresan CD5, aunque a niveles bajos, similar a lo ya previamente reportado en los progenitores hematopoyéticos CD34+ humanos, los cuales expresan niveles bajos de CD5 [80].

En conjunto, nuestros resultados y los estudios en humanos demuestran que las células dendríticas de órganos linfoides y residentes de tejido expresan CD5, aunque los niveles de expresión de CD5 pueden variar dependiendo de la población estudiada.

Como una primera aproximación para determinar si la expresión de CD5 en las DC tenía un efecto funcional, se evaluó el desarrollo de las DC en el ratón deficiente de CD5. Los resultados obtenidos demuestran que CD5 no afecta el desarrollo de las DC en homeostasis ni su generación a partir de progenitores presentes en médula ósea. De igual manera CD5 no tiene un papel relevante en la regulación de la expresión de moléculas coestimuladoras ni co-inhedoras en homeostasis.

Las células dendríticas se encuentran localizadas en zonas anatómicas de alto contacto con antígenos externos, por lo que son consideradas las centinelas del organismo; además, tienen un papel fundamental en establecer un vínculo entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Tras el contacto con un agente patógeno por medio de diversos PRRs, las DC sufren un proceso de maduración el cual incluye la disminución de su capacidad fagocítica, el incremento de receptores de quimiocinas (CCR7) que les permiten migrar a órganos linfoides, así como en un incremento en la expresión de MHC II y moléculas co-estimuladoras. Las células dendríticas, tras la maduración, pueden secretar diferentes citocinas dependiendo del tipo de estímulo recibido para favorecer la diferenciación de las células T [2].

Para evaluar si la expresión de CD5 en las DC afectaba su maduración, BMDCs y DCs de bazo fueron estimuladas con LPS, el cual activa TLR4. Se observó que, si bien CD5 no afecta la expresión de MHC II ni de moléculas co-estimuladoras ni co-inhedoras, la ausencia de CD5 lleva a una mayor producción de IL-12 e IL-23 por las BMDC. De manera interesante, cuando se evaluó la maduración de DC primarias (CD11c+ purificadas de bazo) sólo se observó un incremento en la producción de IL-12, pero no en la de IL-23. Esta discrepancia puede ser explicada por la heterogeneidad de las BMDC, las cuales pueden contener una proporción de macrófagos derivados de monocitos que también expresan CD11c+ [153, 154] y que también pudieran producir citocinas. Por otro lado, es importante considerar que la expresión de CD11c dentro de las diferentes poblaciones de DC no es la homogénea y que, tras su activación y migración, las DC disminuyen la expresión de este marcador; adicionalmente, otras células como los macrófagos pueden llegar

a expresar niveles tan altos como las DC [1]. Por otro lado, la expresión de citocinas en BMDC se determinó midiendo los niveles de expresión de mRNA, mientras que en DC primarias se midió a nivel de proteína por ELISA, por lo que cabe la posibilidad de que el efecto a nivel proteico sea más evidente a tiempos más largos o bien que existan mecanismos de modificación post-traducciona que puedan afectar la expresión de IL-23.

Se ha demostrado que las células cDC CD8 α ⁺ de bazo son las principales células productoras de IL-12 [12, 16]. También ha sido reportado ampliamente que IL-12 es necesaria para la diferenciación de las células T hacia un fenotipo tipo Th1 productor de IL-2 e INF γ [141] y que IL-12 puede favorecer la proliferación de las células T [155, 156]. Adicionalmente, se ha reportado que IL-12 e IL-15 están involucradas en la diferenciación de células T CD8⁺ citotóxicas [157]. Dados estos antecedentes, se evaluó si la ausencia de CD5 en las DC inducía una diferente activación de las células T. Los resultados demuestran que las DC CD5^{-/-} presentan una mayor capacidad de inducir la proliferación de las células T, así como una mayor producción de IL-2 e INF γ , favoreciendo una diferenciación hacia un fenotipo Th1, muy probablemente por medio de la regulación de la expresión de IL-12 por las células DC.

En humanos, se ha demostrado que los niveles de expresión de CD5 en las DC correlaciona con la capacidad de estas células de estimular la proliferación de las células T [79-81], lo cual parece contradecir los resultados observados en este trabajo experimental. Sin embargo, hay muchos factores a considerar al comparar

los resultados, en primera instancia, el tipo de estímulo recibido; mientras que en los estudios de DC humanas se realizan estimulaciones alogénicas, en este estudio se utiliza una estimulación por la vía del TCR por medio de péptidos específicos. Adicionalmente, en los estudios realizados con DC humanas no se puede descartar que las DC CD5^{lo} y CD5^{hi} representen dos subtipos de DC diferentes y no la misma población celular, con grados diferentes de expresión de CD5; estas diferentes poblaciones podrían presentar características y estados de maduración diferentes. Apoyando esta posibilidad, se observó que las DC de sangre periférica humana CD5^{lo} inducen una mayor producción de INF γ por parte de las células T [79], mientras que en piel, las DC CD5⁻ inducen una menor producción de INF γ por las células T que las DC CD5⁺ [80]. Sin embargo, en ambos estudios las células CD5⁺ inducen una mayor proliferación de las células T que las DC CD5⁻ o CD5^{lo}, lo cual contrasta con los datos obtenidos en nuestro estudio. Adicionalmente, en los estudios en humanos se observó que los patrones de expresión de TLR entre las subpoblaciones de CD1c en sangre son diferentes: las DC CD5^{hi} expresan mayores niveles de TLR7 y TLR8, así como menores niveles de TLR3 que las DC CD5^{lo} [79]. En este contexto, la expresión de diferentes patrones de expresión de TLR ha sido utilizado para diferenciar las subpoblaciones de DC [1]. Sin embargo, aun no se ha determinado si la expresión de CD5 define subpoblaciones dentro de un mismo tipo de DC o bien subpoblaciones diferentes de DC. Tampoco se ha dilucidado el posible mecanismo a través del cual CD5 podría regular la producción de INF γ por las células T.

El incremento en la proliferación y producción de citocinas tipo Th1 inducido por las DC CD5^{-/-}, presenta una relevancia funcional *in vivo*, puesto que la ausencia de CD5 favorece la capacidad de las DC de estimular una respuesta antitumoral en un modelo murino de melanoma, y también las DC CD5^{-/-} fueron capaces de inducir una mayor respuesta de hipersensibilidad por contacto comparado con las DC WT.

Para demostrar que los efectos observados eran directamente mediados por la expresión de CD5, se reestableció la expresión de CD5 en las DC CD5^{-/-} por medio de la infección con adenovirus que expresaban CD5 o la proteína GFP como control. Los resultados obtenidos demuestran que la restauración de la expresión de CD5 reduce a niveles "normales" la capacidad de las células DC de producir IL-12, así como la capacidad de inducir la proliferación y la producción de citocinas por las células T. De manera interesante, la restauración de la expresión de CD5 por medio de la infección viral resulta en una mayor expresión de CD5 en las células infectadas que en aquellas células WT; esta mayor expresión de CD5 conlleva a una producción de IL-12 aún más disminuida que la producida por las células WT e inclusive llega a niveles indetectables, lo que sugiere que la producción de IL-12 correlaciona inversamente con los niveles de expresión de CD5. Demostrando de esta manera que CD5 regula la producción de IL-12 por las DC y que esto depende de los niveles de expresión de CD5.

Se ha demostrado que la regulación de CD5 en procesos como la regulación de la intensidad de las señales del TCR, la supervivencia celular, la generación de anergia o la generación de Tregs, correlaciona con los niveles de expresión de CD5

en los linfocitos T [140]. La correlación entre la menor producción de IL-12 por las DC que expresan niveles mayores de CD5 sugiere que la capacidad de las DC de estimular a las células T puede no estar mediada solo por la naturaleza de cada subpoblación de DC, sino también por los niveles de expresión de CD5.

Las células T CD8+ y las células T CD4+ con un perfil tipo Th1 tienen un papel importante en la regulación de la respuesta antitumoral [142, 143]. Terapias basadas en DC que favorecen las respuestas de células T CD8+ y Th1 han sido ampliamente estudiadas para su uso en pacientes con cáncer [158]. Sin embargo, incrementar la eficiencia y seguridad de este tipo de terapias sigue siendo una prioridad. Nuestros resultados demuestran que la ausencia de CD5 en las células DC lleva a una mejor respuesta antitumoral y una mayor respuesta de hipersensibilidad mediada por contacto. Esta mayor capacidad está directamente relacionada a la ausencia de CD5, ya que la re-expresión de este receptor en las DC lleva a una mejor respuesta de hipersensibilidad, comparable con aquella producida por células WT.

El sistema inmune cuenta con vías que funcionan como puntos de control, lo cual le permite mantener la tolerancia a lo propio y limitar el daño a tejido tras una respuesta hacia algún patógeno o algún daño. Estos puntos de control consisten en varias vías inhibitorias que funcionan como reguladores homeostáticos. Sin embargo, estos mecanismos de control pueden ser aprovechados por células tumorales para evadir la respuesta inmune. Como terapia antitumoral se han utilizado bloqueadores de estos puntos de control para activar la respuesta antitumoral, lo cual ha

demostrado tener un efecto positivo para lograr la regresión tumoral tanto en modelos murinos como en ensayos con humanos. Los principales puntos de control utilizados como terapia es el bloqueo de CTLA-4 y la vía PD1-PDL1 [159].

CTLA-4 se expresa en células T activadas y en Tregs e inhibe la unión de CD28 con las moléculas costimuladoras CD80/86, lo cual resulta en una inhibición de las señales del TCR. Por ello, el bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos aumenta la unión de CD28 a CD80/86 favoreciendo la activación de las células T y eliminando a las Tregs presentes en el microambiente tumoral [160]. De igual manera PD-1 se expresa en células T tras su activación, mientras que la expresión de sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) está regulada por citocinas inflamatorias, la estimulación de PD-1 por sus ligandos inhibe la señalización río debajo del TCR [161]. Algunas otras moléculas que funcionan como puntos de control son LAG-3, TIM-3, IDO, CD73, todas ellas inhiben la activación de las células T y el bloqueo de ellas está siendo estudiado como posible terapia antitumoral [162]. Dado que CD5 actúa como un regulador negativo de las señales del TCR y su expresión se incrementa tras la activación, nuestros resultados sugieren una posible nueva estrategia terapéutica en la cual el bloqueo de CD5 en las DC favorecería la producción de IL-12 y un incremento en las respuestas tipo Th1 y de células CD8+, lo cual podría funcionar para co-adyuvar la terapia antitumoral convencional.

Como se mencionó anteriormente, las DC no sólo son importantes para activar la respuesta inmune tras estímulos de peligro, también son fundamentales en la

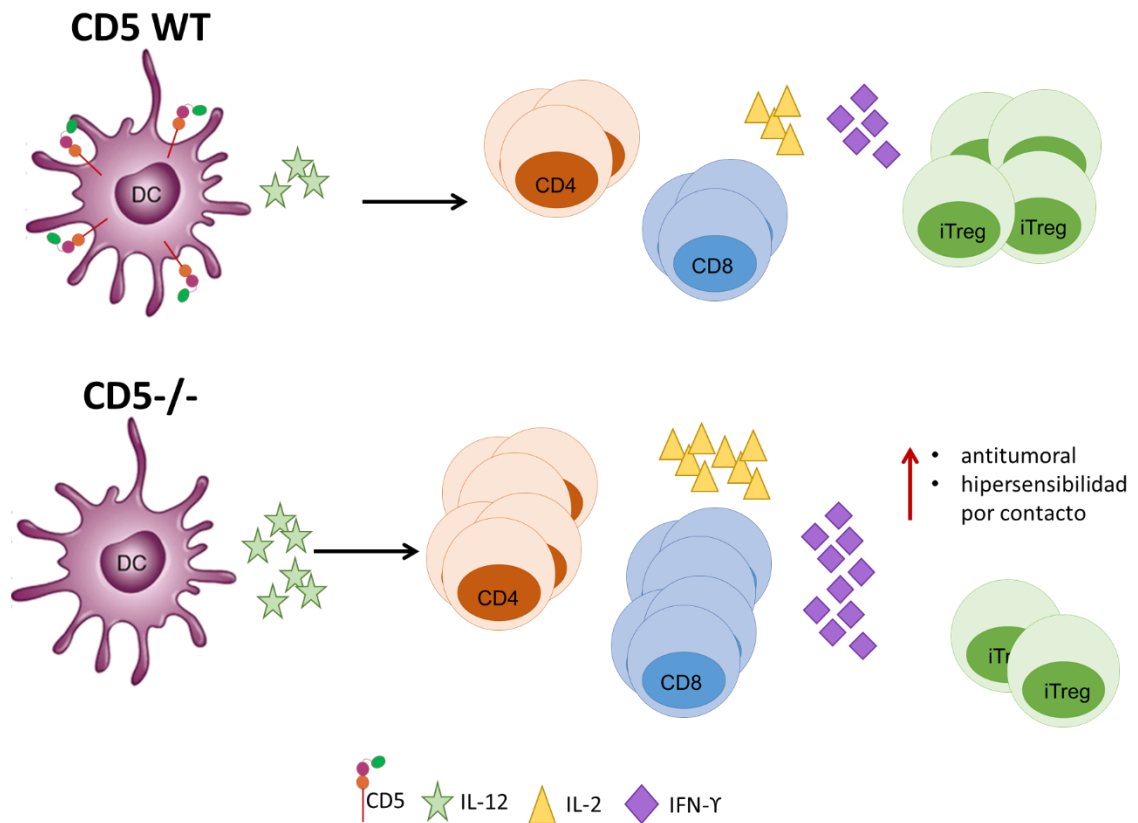


Figura 22. La expresión de CD5 en DC inhibe la producción de IL-12 y favorece la diferenciación hacia iTregs. CD5 es expresado en todas las DCs en órganos linfoides y no linfoides. La ausencia de CD5 favorece la producción de IL-12 por las DC lo que lleva a una mayor proliferación de las células T CD4+ y CD8+ así como a una mayor producción de IL-2 e IFN γ por las células T, esto favorece la respuesta antitumoral y las respuestas de hipersensibilidad mediada por contacto. La ausencia de CD5 en la DC inhibe la diferenciación de las células T CD4+ hacia iTregs por mecanismos aun no conocidos.

generación de tolerancia, tal y como lo demuestran modelos murinos donde la eliminación selectiva de DC lleva a procesos autoinmunes fatales [2]. En este sentido, se ha demostrado que las DC tienen un papel fundamental en la generación de Tregs. Se ha reportado que las DC maduras en ambientes ricos en TGF β e IL-10 pueden adquirir un fenotipo tolerogénico que favorece la generación de Tregs; adicionalmente, se ha observado que en mucosas existen poblaciones con características especiales que favorecen la inducción de tolerancia; un ejemplo de

esto son las DC CD103+ en intestino que producen altos niveles de TGF β y ácido retinoico [24]. De igual manera, se ha descrito que CD5 expresado en las células T juega un papel importante en la generación de Tregs [127]. Por ello, nos preguntamos si la expresión de CD5 en las DC pudiera afectar la generación de Tregs. Los resultados obtenidos demuestran que la ausencia de CD5 ya sea en la célula T o en la DC, tienen como resultado una menor inducción de Treg. Previamente, ya había sido descrito que la ausencia de CD5 en linfocitos T, induce una menor generación de Tregs por un mecanismo que involucra la activación de los receptores de citocinas y la activación de la vía PI3K/mTOR y, consecuentemente, inhibiendo la expresión de Foxp3 [127]; en este sentido, la mayor producción de IL-12 por las DC CD5-/- pudiera contribuir al efecto observado en los cultivos con células T WT y DC CD5-/- en los cuales se ve una menor inducción de Tregs comparado con los cultivos con células T WT y DC WT.

Es de llamar la atención que, las DC CD5-/- inducen una mayor proliferación y una menor expresión de Foxp3 en las Tregs comparado con las DC WT. En este sentido, ha sido reportado que IL-12 inhibe la proliferación y disminuye la expresión de Foxp3 y la capacidad supresora de las Tregs [163, 164]. Aunque estos datos parecen contradictorios con los resultados obtenidos en este trabajo, es importante considerar que en estos co-cultivos se pueden estar generando múltiples citocinas al mismo tiempo. En este contexto, IL-2 producida por los linfocitos T activados, juega un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y función de las Treg [165]. Adicionalmente, se ha reportado que INF γ favorece la proliferación de las

Tregs en fases avanzadas de las respuestas tipo Th1 como un mecanismo de autocontrol de la respuesta [166]. Cabe mencionar que, si bien las condiciones de cultivo favorecen la generación de Tregs, en estos cultivos también pueden estarse generando células Th1 por la mayor producción de IL-12 por parte de las DC CD5^{-/-}, por lo que el efecto observado puede ser un balance entre la mayor producción de IL-12 por las DC CD5^{-/-} y la mayor producción de IL-2 e INF γ producida por las células T. Por otro lado, sería importante evaluar la producción de citocinas anti-Inflamatorias importantes para la generación de Tregs como los son TGF β e IL-10 por parte de las DC CD5^{-/-}. Es importante realizar más experimentos que nos permitan dilucidar cual es el mecanismo por el cual CD5 regula la generación y función de las Tregs, así como cuál es el dominio funcional de CD5 responsable de los efectos observados.

Los mecanismos moleculares por los cuales CD5 regula la producción de IL-12 por las DC aún se desconocen y son un campo de futura investigación, al igual que el dominio funcional de CD5 importante para la regulación de la función de las células DC. Adicionalmente, se ha reportado que interacciones homotípicas CD5-CD5 pueden presentarse [85], si estas interacciones pudieran ser relevantes para la modulación de la función de las DC y su capacidad de inducir respuestas inmunes aún debe ser estudiado.

11.2 Papel del dominio de unión de CK2 a CD5 en la generación y función de las células T reguladoras

La generación de Tregs en timo requiere de una óptima señalización del TCR. Se ha descrito que la generación de Tregs requiere de una fuerza de las señales del TCR más alta que aquella requerida para la selección positiva, pero más baja que aquella que lleva a la selección negativa (muerte por exceso de señal) (revisado en [140]). De tal manera, se ha observado que aquellas moléculas que regulan negativamente las señales del TCR, favorecen la generación de tTregs. Sin embargo, para la generación de Tregs en periferia se requiere un umbral de activación del TCR diferente, de manera que aquellas moléculas que favorecen la generación de tTregs pueden inhibir la generación de pTregs; en este contexto, se ha observado que una fuerte coestimulación por CD28 favorece la generación de tTregs pero inhibe la generación de pTregs o iTregs [124].

CD5 es un conocido regulador negativo de las señales del TCR y, al igual que otros reguladores de las señales del TCR, su papel en la generación de células Tregs es diferente en el timo y en la periferia. En este contexto ha sido reportado que la ausencia de CD5 favorece la generación de tTregs y protege a estas células de la muerte celular [111]. Por otro lado, se ha visto que la ausencia de CD5 inhibe la generación de pTreg o iTreg [127]. Sin embargo, aún no se ha determinado cual es el/los dominios funcionales de CD5 responsables que pudieran regular la generación de Tregs.

Previamente, había sido reportado que la ausencia del CD5-CK2BD no parecía afectar la generación de Tregs; sin embargo, en este estudio no se hizo un análisis detallado de las Tregs en este ratón [108]. Nuestros resultados muestran que en ausencia de este dominio funcional no hay diferencias en porcentajes y números totales de tTregs ni pTregs, en ninguno de los órganos linfoides evaluados en condiciones homeostáticas. Estos resultados sugieren que el CD5-CK2BD no es responsable del incremento en tTregs observado en ausencia de CD5 en condiciones homeostáticas, implicando que otro dominio o el conjunto de dominios de CD5 podrían ser importantes para mediar este efecto. Sin embargo, estos datos no excluyen la posibilidad de que este dominio de CD5 pudiera afectar otros aspectos de la biología de las Tregs.

En el ratón CD5 Δ CK2 la expresión de CD5 se da en condiciones fisiológicas, lo cual nos permite adicionalmente estudiar la biología de CD5 [108, 113]. De manera interesante, al evaluar la expresión de CD5 en las Tregs CD5 Δ CK2 observamos una menor expresión de este receptor comparado con las Tregs WT. En este contexto ha sido reportado que la expresión de CD5 es regulada por la intensidad de las señales del TCR [96], esto quiere decir que a una mayor intensidad de las señales del TCR se presenta una mayor expresión de CD5. Adicionalmente, se ha reportado que los timocitos del ratón CD5 Δ CK2 presentan niveles incrementados de Erk fosforilado, lo cual sugiere un incremento en las señales del TCR; sin embargo, en este modelo las señales proximales del TCR permanecen sin cambios, y la expresión de CD5 en los timocitos no presentan una diferencia entre el ratón

CD5 Δ CK2 y WT [108]. Tomando en consideración estos datos, la menor expresión de CD5 en las Tregs CD5 Δ CK2 es inesperada. Estos resultados sugieren que el CD5-CK2BD puede ser importante en la regulación de la expresión de CD5 por mecanismos aún no conocidos.

Se ha reportado que tras la activación del TCR, c-Cbl puede asociarse físicamente con CD5, lo cual resulta en su ubiquitinación y en su posterior degradación [98, 167]. Posteriormente, fue reportado que c-Cbl se asocia a CD5 en la región carboxilo-terminal de este último, sugiriendo que la tirosina Y463 puede ser relevante para esta asociación [100]. De igual manera, el CD5-CK2BD se encuentra en la región carboxilo-terminal de CD5. Finalmente, se ha reportado que la subunidad μ 2 del complejo adaptador AP2 está asociada a CD5 y que este complejo puede mediar la internalización de CD5 [86].

Por otro lado, altos niveles de expresión de Nr4a1, un receptor nuclear cuya expresión se da tras la estimulación del TCR, se han descrito en las Tregs, lo que sugiere que las Tregs constantemente están siendo estimuladas a través del TCR, probablemente por su antígeno de alta afinidad [168]. Esta constante activación del TCR podría permitir la asociación de c-Cbl a CD5 y su posterior ubiquitinación y degradación. Además de la menor expresión de CD5 en las Tregs CD5 Δ CK2, estas células también presentan una menor expresión de Foxp3.

Previamente, había sido reportado que en ausencia de CD5, las Tregs presentes en el colon en un modelo de colitis inducida por dextrano, presentan niveles mayores de mRNA de Foxp3 [125]. En este contexto, se ha descrito que CK2 es

importante en la biología de las Tregs; se ha reportado que la delección condicional de CK2 específicamente en las Tregs no afecta la generación de estas células, pero inhibe la capacidad supresora de esta población hacia respuestas tipo Th2 [129]. En este modelo se observó una menor expresión de Foxp3 en aquellas células deficientes de CK2, sin embargo, el efecto de esta menor expresión de Foxp3 en las Tregs no se discutió en este estudio. Estos datos sugieren que la expresión de Foxp3 en las Tregs podría estar regulada por CK2, y que la señalización CK2-CD5 podría estar involucrada en este proceso de regulación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio se eliminó todo el CK2 en las células Foxp3+, y no solamente el que estaría asociado a CD5 como ocurre en nuestro modelo.

La expresión de Foxp3 está altamente relacionada con la capacidad supresora de las Tregs: a mayor expresión de Foxp3 se da una mayor supresión [148]. Se ha reportado que las células Tregs CD5^{-/-} presentan una mayor capacidad supresora comparada con las Tregs WT [111, 125]. Debido a que las células Tregs CD5 Δ CK2 presentan niveles menores de expresión de Foxp3, la capacidad supresora de estas células podría estar disminuida. De manera interesante, al evaluar la capacidad supresora de las Tregs CD5 Δ CK2, no se observó una diferencia con respecto a las Tregs WT a ninguna de las concentraciones de estímulo usadas (Fig. 22) . Si bien estos resultados podrían parecer contradictorios, en un modelo en el cual se depleta CK2 específicamente de las Tregs se observó que en condiciones no polarizantes no se presentaban diferencias en la capacidad supresora de las Tregs deficientes de CK2 comparado con las Tregs WT; sin embargo, cuando los ensayos de

supresión se hacían en condiciones polarizantes a Th2 las células deficientes de CK2 presentaron una menor capacidad supresora que las Tregs WT, demostrando que CK2 solo regula la capacidad de las Tregs de suprimir respuestas tipo Th2 [129]. Por ello, es importante, antes de concluir si la ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 no tiene un efecto funcional en la regulación de la capacidad supresora de las Tregs, se realicen ensayos de supresión en distintas condiciones polarizantes o en modelos de respuesta tipo Th2 como aquellos de asma o alergias.

En condiciones homeostáticas no se observan diferencias en los porcentajes ni números totales en las Tregs de ratones WT y CD5 Δ CK2, este efecto podría deberse a un balance entre la generación y la muerte de estas células, ya que se ha reportado que el CD5-CK2BD es importante para la regulación de la muerte celular en timocitos [108]. Adicionalmente, se ha reportado que CD5 está involucrado en la inducción de Tregs. Henderson y colaboradores demostraron que las células T CD4⁺/CD25⁻ que presentan niveles menores de expresión de CD5 o células deficientes de CD5 son menos susceptibles a convertirse en Tregs que aquellas con alta expresión de CD5; este efecto se debe, en parte, a que CD5 inhibe la activación de la vía PI3K/mTOR mediada por la activación de receptores de citocinas efectoras como IL-4, IL-6 o INF γ [127]. Sin embargo, en este estudio no se demostró si la intensidad de las señales recibidas por el TCR se ven afectadas, ni qué dominio funcional de CD5 es responsable de este efecto (**Fig 6E**). El CD5-CK2BD se ha visto involucrado en la diferenciación de células T, en ausencia de este dominio se presenta una menor diferenciación hacia Th1 y Th17 [112]. De

igual manera, se ha reportado que la inhibición farmacológica o genética de CK2 en células T CD4+ disminuye la diferenciación hacia Th17 e incrementa la inducción de Treg [130-132]. Nuestros resultados demuestran que la ausencia del CD5-CK2BD favorece la inducción de células T reguladoras. Las Tregs CD5 Δ CK2 presentan una mayor expresión de Foxp3, pero una menor expresión de CD5. Adicionalmente, las Tregs CD5 Δ CK2 hipoproliferan en comparación con las Tregs WT, esto último es consistente con la hipoproliferación de las células T CD4+ reportada anteriormente [113]. Los efectos observados en la generación de Tregs CD5 Δ CK2 sugieren que otros dominios de CD5 son importantes para la generación de Tregs. Estos resultados también sugieren que algunos de los efectos mediados por CK2 pudieran estar regulados por CD5, ya que tanto la ausencia de CK2, como del CD5-CK2BD, favorecen la inducción de Tregs y la expresión de Foxp3 [130-132].

Los resultados obtenidos en la eliminación condicional de CK2 en las Tregs y en la inhibición farmacológica de CK2 o en ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 pudieran resultar contradictorios, pero es importante recalcar que hay una gran diferencia entre eliminar CK2 de toda la población de células T CD4+, que solo afectar su expresión en las Tregs. CK2 es una proteína activa que se encuentra expresada ubicuamente; sin embargo, se ha reportado que su actividad y expresión se incrementan tras la estimulación del TCR y que las Tregs presentan una mayor expresión y actividad de CK2. Por lo tanto, es posible que el papel del dominio de

unión de CK2 a CD5 sea diferente durante la inducción de Treg y durante en el mantenimiento de la función y el fenotipo de las mismas.

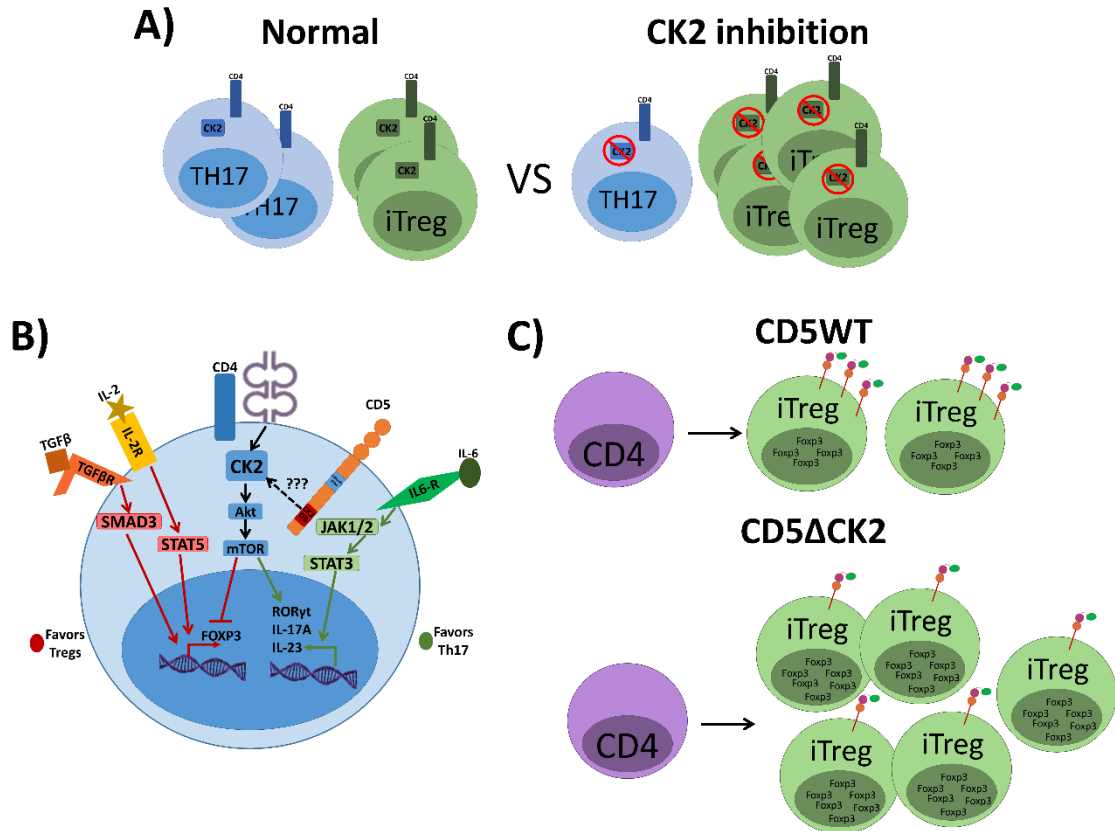


Figura 23. El dominio de unión de CK2 a CD5 inhibe la diferenciación hacia iTregs. A) La inhibición farmacológica o el silenciamiento genético de CK2 en las células T CD4+ tiene como resultado una menor diferenciación hacia Th17 y un incremento de la diferenciación hacia iTregs B) La inhibición farmacológica o genética de CK2 en células T CD4+ lleva a una menor fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6, sin afectar las respuestas hacia IL-2 o TGFβ, ya que no se presentan diferencias en la fosforilación de STAT5 o Smad2/3. CK2 también inhibe la activación de Akt, promoviendo la generación de Tregs e inhibiendo la diferenciación hacia Th17. C) CK2 se asocia de manera constitutiva a CD5, la ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 inhibe la fosforilación de Akt dependiente del TCR, lo cual lleva a una menor diferenciación hacia Th17. De igual manera la ausencia de este dominio favorece la diferenciación hacia iTregs, y la expresión de Foxp3 en estas células

La vía PI3K/Akt/mTOR ha sido ampliamente descrita en la regulación de la diferenciación de las células T CD4 hacia los diferentes linajes. Por ejemplo, la estimulación sostenida del TCR activa esta vía y promueve la diferenciación hacia

fenotipos inflamatorios, mientras que inhibe la síntesis *de novo* de Foxp3, inhibiendo la generación de Tregs [124]. Otra vía ampliamente descrita en la diferenciación de las células T es la vía JAK/STAT, la cual se activa principalmente en respuesta a citocinas [169]. En este contexto, se ha reportado que CK2 es un regulador de la vía PI3K/Akt/mTOR, directamente favoreciendo la actividad de Akt e indirectamente, por medio de la inhibición de PTEN [128]. También se ha reportado que CK2 es necesario para la señalización de JAK/STAT en respuesta a señales de supervivencia, como la señalización por IL-6R, incrementando la fosforilación de STAT3 por la interacción con JAK3 [170-172]. Con relación a esto, ha sido recientemente reportado que la inhibición farmacológica o genética de CK2 en células T CD4+ lleva a una menor fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6, sin afectar las respuestas hacia IL-2 o TGF β , ya que no se presentan diferencias en la fosforilación de STAT5 o Smad2/3. De manera interesante, la inhibición de CK2 también inhibe la activación de Akt, promoviendo la generación de Tregs e inhibiendo la diferenciación hacia Th17 [130-132]. De igual manera, se ha reportado que en ausencia de CD5, los timocitos presentan una mayor fosforilación basal de Akt [111], adicionalmente, se ha reportado que la estimulación de CD5 incrementa significativamente la diferenciación de Th17 por una fosforilación sostenida de STAT3 [120]. Finalmente, se ha reportado que la ausencia del CD5-CK2BD inhibe la fosforilación de Akt dependiente del TCR, lo cual se traduce en una reducción de la fosforilación de GSK3 β y un incremento en la degradación de β -catenina, lo cual lleva a una menor diferenciación hacia Th17 [112]. La menor expresión de β -

catenina también es observada cuando se deleta condicionalmente CK2 en las Tregs [129]. Conociendo estos antecedentes es importante evaluar la fosforilación de moléculas como Akt, STAT3, Smad2/3 en la Tregs CD5 Δ CK2 y durante el proceso de activación y diferenciación de las mismas; esto nos permitiría evaluar si los efectos observados por la inhibición de CK2 están mediados por su unión a CD5 y si existen efectos adicionales mediados por la señalización de CD5.

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo indican que el CD5 tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, a través de modular la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ por parte de la DC, así como en linfocitos T favoreciendo la generación y proliferación de iTregs, a través de mecanismos moleculares que podrían involucrar al dominio CK2 presente en la cola citoplasmática de CD5.

12 CONCLUSIONES

En este proyecto se demostró la expresión de CD5 en células dendríticas murinas en órganos linfoides y no linfoides. La expresión de CD5 en células dendríticas regula negativamente la producción de IL-12, así como su capacidad para inducir la proliferación de células T CD4+ y CD8+. De igual manera, la expresión de CD5 en las DC disminuye la capacidad de estas células de promover respuestas Th1 y de inducir una respuesta antitumoral y de hipersensibilidad mediada por contacto. Se demostró que la expresión de CD5 en las DC favorece la generación de Tregs y la expresión de Foxp3 en las mismas. Nuestros resultados demuestran un papel de

CD5, no conocido previamente, en la regulación de la actividad de las células DC y su capacidad de regular las respuestas inmunes.

Se demostró que el dominio de unión de CK2 a CD5 no es relevante para la generación de Tregs en homeostasis. Sin embargo, favorece la expresión de CD5 y Foxp3 en estas células, sugiriendo un papel relevante en la biología de esta población celular. Se demostró también que la ausencia del dominio de unión de CK2 a CD5 favorece la generación de Tregs inducidas, contrario a lo observado en ausencia de CD5. En conjunto los resultados obtenidos indican que el balance entre los distintos dominios funcionales de CD5 y las moléculas que se asocian a su cola citoplásmica son importantes para mantener la homeostasis de las Tregs. antitumoral

13 PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar la producción de citocinas por las DC CD5^{-/-} bajo estímulos no inflamatorios.
- ❖ Evaluar el dominio de CD5 importante para la regulación de la producción de IL-12 por las DC.
- ❖ Evaluar el papel del CD5-CK2BD en la generación de células T reguladoras *in vivo*.
- ❖ Evaluar la función supresora de las Tregs del ratón CD5 Δ CK2 *in vivo* y en condiciones polarizantes a Th2.
- ❖ Analizar las vías de señalización involucradas en el incremento en la generación de iTregs mediado por el CD5-CK2BD.
- ❖ Evaluar el papel del CD5-CK2BD en la supervivencia de las Tregs.
- ❖ Analizar el papel del dominio pseudo-ITIM de CD5 en la generación, función y supervivencia de las Treg.

14 REFERENCIAS

1. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 563-604.
2. Pulendran, B., *The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 563-606.
3. Poulin, L.F., et al., *Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
4. Bachem, A., et al., *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1273-81.
5. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. *J Exp Med*, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
6. Lenz, A., et al., *Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(6): p. 2587-96.
7. Haniffa, M., et al., *Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells*. *Immunity*, 2012. **37**(1): p. 60-73.
8. Poulin, L.F., et al., *DNNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues*. *Blood*, 2012. **119**(25): p. 6052-62.
9. Idoyaga, J., et al., *Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(5): p. 1524-9.
10. Gerner, M.Y., et al., *Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes*. *Immunity*, 2012. **37**(2): p. 364-76.
11. Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri, *The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(6): p. 417-28.
12. Farrand, K.J., et al., *Langerin+ CD8alpha+ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7732-42.
13. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1179-87.
14. den Haan, J.M. and M.J. Bevan, *Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo*. *J Exp Med*, 2002. **196**(6): p. 817-27.
15. Pulendran, B., et al., *Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(3): p. 1036-41.
16. Maldonado-Lopez, R., et al., *CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo*. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 587-92.
17. Kinnebrew, M.A., et al., *Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense*. *Immunity*, 2012. **36**(2): p. 276-87.

18. Rahman, S., et al., *Murine FLT3 ligand-derived dendritic cell-mediated early immune responses are critical to controlling cell-free human T cell leukemia virus type 1 infection*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 390-402.
19. Ohnmacht, C., et al., *Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 549-59.
20. Perry, J.S.A., et al., *Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus*. Immunity, 2014. **41**(3): p. 414-426.
21. Steinbrink, K., et al., *CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2468-76.
22. Huang, F.P., et al., *A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 435-44.
23. Manicassamy, S. and B. Pulendran, *Dendritic cell control of tolerogenic responses*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 206-27.
24. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
25. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
26. Benson, M.J., et al., *All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1765-74.
27. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
28. Quintana, F.J., et al., *An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(48): p. 20768-73.
29. Takenaka, M.C., et al., *Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through beta2-Adrenergic Receptor-Mediated Inhibition of NF-kappaB and AP-1 in Dendritic Cells*. J Immunol, 2016. **196**(2): p. 637-44.
30. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
31. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
32. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
33. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
34. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
35. Fu, W., et al., *A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 972-80.
36. Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 277-84.

37. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 307-8.
38. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
39. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
40. Weiss, J.M., et al., *Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1723-42, S1.
41. Ohkura, N., et al., *T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 785-99.
42. Hilbrands, R., et al., *Induced Foxp3(+) T Cells Colonizing Tolerated Allografts Exhibit the Hypomethylation Pattern Typical of Mature Regulatory T Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 124.
43. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
44. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
45. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
46. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
47. Caridade, M., L. Graca, and R.M. Ribeiro, *Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 378.
48. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
49. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
50. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
51. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
52. Wong, P., et al., *Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1179-87.
53. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 267-77.
54. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
55. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.

56. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(2): p. 152-62.
57. Mantel, P.Y., et al., *Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(6): p. 3593-602.
58. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
59. Vang, K.B., et al., *IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development*. *J Immunol*, 2008. **181**(5): p. 3285-90.
60. Burchill, M.A., et al., *Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 112-21.
61. Lio, C.W. and C.S. Hsieh, *A two-step process for thymic regulatory T cell development*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 100-11.
62. Ouyang, W., et al., *Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development*. *Immunity*, 2010. **32**(5): p. 642-53.
63. Sharabi, A., et al., *Regulatory T cells in the treatment of disease*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018. **17**: p. 823.
64. Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison, *TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1701-11.
65. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
66. Marie, J.C., et al., *TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(7): p. 1061-7.
67. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
68. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
69. Horwitz, D.A., et al., *Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 912-5.
70. Yao, Z., et al., *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4368-75.
71. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
72. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 733-58.
73. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. *Science*, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
74. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. *Science*, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
75. Berland, R. and H.H. Wortis, *Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 253-300.
76. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. *Immunol Rev*, 2004. **197**: p. 179-91.

77. Tung, J.W., et al., *The regulation of CD5 expression in murine T cells*. BMC Mol Biol, 2001. **2**: p. 5.
78. Azzam, H.S., et al., *Fine tuning of TCR signaling by CD5*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5464-72.
79. Yin, X., et al., *Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions*. J Immunol, 2017. **198**(4): p. 1553-1564.
80. Korenfeld, D., et al., *A type of human skin dendritic cell marked by CD5 is associated with the development of inflammatory skin disease*. JCI Insight, 2017. **2**(18).
81. Zhang, H., et al., *A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(8): p. 1988-1993.
82. Yang, Y., et al., *The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3898-902.
83. Van de Velde, H., et al., *The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5*. Nature, 1991. **351**(6328): p. 662-5.
84. Pospisil, R., M.G. Fitts, and R.G. Mage, *CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1279-84.
85. Brown, M.H. and E. Lacey, *A ligand for CD5 is CD5*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 6068-74.
86. Raman, C., et al., *Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19183-9.
87. Calvo, J., et al., *Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6022-9.
88. Vila, J.M., et al., *Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 396-402.
89. Ledbetter, J.A., et al., *Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2331-6.
90. Ceuppens, J.L. and M.L. Baroja, *Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3*. J Immunol, 1986. **137**(6): p. 1816-21.
91. Alberola-Ila, J., et al., *Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation*. J Immunol, 1992. **148**(5): p. 1287-93.
92. Simarro, M., et al., *The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4307-15.
93. Simarro, M., et al., *Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5149-55.
94. Tarakhovskiy, A., et al., *A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection*. Science, 1995. **269**(5223): p. 535-7.
95. Tarakhovskiy, A., W. Muller, and K. Rajewsky, *Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice*. Eur J Immunol, 1994. **24**(7): p. 1678-84.
96. Azzam, H.S., et al., *CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2301-11.
97. Perez-Villar, J.J., et al., *CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2903-12.

98. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1617-25.
99. Dennehy, K.M., et al., *Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5*. Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 679-86.
100. Roa, N.S., et al., *The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR signaling downmodulation in thymocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **432**(1): p. 52-9.
101. Raman, C. and R.P. Kimberly, *Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5817-20.
102. Strasser, A., et al., *What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(1): p. 57-66.
103. Zhou, X.Y., et al., *CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1260-8.
104. Friedlein, G., et al., *Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6821-7.
105. Ryan, K.R., D. McCue, and S.M. Anderton, *Fas-mediated death and sensory adaptation limit the pathogenic potential of autoreactive T cells after strong antigenic stimulation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 43-50.
106. Axtell, R.C., et al., *Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2928-32.
107. Axtell, R.C., et al., *CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8542-9.
108. Mier-Aguilar, C.A., et al., *CD5-CK2 Signaling Modulates Erk Activation and Thymocyte Survival*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168155.
109. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
110. Gringhuis, S.I., et al., *Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1725-35.
111. Ordonez-Rueda, D., et al., *Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2233-47.
112. McGuire, D.J., et al., *CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization*. Eur J Immunol, 2014. **44**(4): p. 1137-42.
113. Sestero, C.M., et al., *CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2918-30.
114. Mier-Aguilar, C.A., et al., *Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **466**(3): p. 381-7.
115. Pena-Rossi, C., et al., *Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6494-501.

116. Stamou, P., et al., *Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells.* J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1278-84.
117. Tabbekh, M., et al., *Rescue of tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death enhances the antitumor CTL response in CD5-deficient mice.* J Immunol, 2011. **187**(1): p. 102-9.
118. Dorothee, G., et al., *In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity.* J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6888-97.
119. Kurebayashi, Y., et al., *PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma.* Cell Rep, 2012. **1**(4): p. 360-73.
120. de Wit, J., et al., *CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation.* Blood, 2011. **118**(23): p. 6107-14.
121. Calvo, J., et al., *Identification of a natural soluble form of human CD5.* Tissue Antigens, 1999. **54**(2): p. 128-37.
122. Fenutria, R., et al., *Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84895.
123. Gary-Gouy, H., et al., *Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4537-43.
124. Li, M.O. and A.Y. Rudensky, *T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function.* Nat Rev Immunol, 2016. **16**(4): p. 220-33.
125. Dasu, T., et al., *CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells.* Immunol Lett, 2008. **119**(1-2): p. 103-13.
126. Hawiger, D., et al., *Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 695-705.
127. Henderson, J.G., et al., *CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens.* Immunity, 2015. **42**(3): p. 471-83.
128. Ruzzene, M., et al., *Cross-talk between the CK2 and AKT signaling pathways in cancer.* Adv Biol Regul, 2017. **64**: p. 1-8.
129. Ulges, A., et al., *Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo.* Nature Immunology, 2015. **16**: p. 267.
130. Ulges, A., et al., *Protein kinase CK2 governs the molecular decision between encephalitogenic TH17 cell and Treg cell development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(36): p. 10145-50.
131. Gibson, S.A., et al., *Protein Kinase CK2 Controls the Fate between Th17 Cell and Regulatory T Cell Differentiation.* J Immunol, 2017. **198**(11): p. 4244-4254.
132. Jang, S.W., et al., *Casein kinase 2 is a critical determinant of the balance of Th17 and Treg cell differentiation.* Exp Mol Med, 2017. **49**(9): p. e375.
133. Barnden, M.J., et al., *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.* Immunol Cell Biol, 1998. **76**(1): p. 34-40.
134. Hogquist, K.A., et al., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection.* Cell, 1994. **76**(1): p. 17-27.

135. Bettelli, E., et al., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1073-81.
136. Haribhai, D., et al., *Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2961-72.
137. He, D., et al., *IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells*. The Journal of Immunology, 2010. **184**(5): p. 2281-2288.
138. Idoyaga, J., et al., *Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 844-54.
139. Olguin-Alor, R., et al., *A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167813.
140. Burgueño-Bucio, E., C.A. Mier-Aguilar, and G. Soldevila, *The multiple faces of CD5*. Journal of Leukocyte Biology, 2019. **105**(5): p. 891-904.
141. Tait Wojno, E.D., C.A. Hunter, and J.S. Stumhofer, *The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 851-870.
142. Braumuller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. **494**(7437): p. 361-5.
143. Dobrzanski, M.J., et al., *Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1380-90.
144. He, D., et al., *IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1463-70.
145. Vocanson, M., et al., *Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis*. Expert Rev Clin Immunol, 2005. **1**(1): p. 75-86.
146. Peiser, M., *Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 261037.
147. Hasegawa, H. and T. Matsumoto, *Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 350.
148. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression*. Proceedings of the American Thoracic Society, 2007. **4**(3): p. 271-276.
149. Alvarez Salazar, E.K., et al., *Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 219.
150. De Bernardis, F., et al., *Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of Candida albicans vaginitis*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 4282-94.
151. Wood, G.S. and P.S. Freudenthal, *CD5 monoclonal antibodies react with human peripheral blood dendritic cells*. Am J Pathol, 1992. **141**(4): p. 789-95.
152. Vermaelen, K.Y., et al., *Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes*. J Exp Med, 2001. **193**(1): p. 51-60.
153. Xu, Y., et al., *Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7577-84.
154. Helft, J., et al., *GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1197-211.

155. Gately, M.K., et al., *Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)*. J Immunol, 1991. **147**(3): p. 874-82.
156. Yanagida, T., et al., *Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 clone*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 4919-28.
157. Pulendran, B., *Immune activation: death, danger and dendritic cells*. Curr Biol, 2004. **14**(1): p. R30-2.
158. Homey, B., A. Muller, and A. Zlotnik, *Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer?* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 175-84.
159. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 450-61.
160. Park, Y.J., D.S. Kuen, and Y. Chung, *Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance*. Exp Mol Med, 2018. **50**(8): p. 109.
161. Zuazo, M., et al., *Molecular mechanisms of programmed cell death-1 dependent T cell suppression: relevance for immunotherapy*. Ann Transl Med, 2017. **5**(19): p. 385.
162. Ruffo, E., et al., *Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor*. Semin Immunol, 2019. **42**: p. 101305.
163. Dominguez-Villar, M., C.M. Baecher-Allan, and D.A. Hafler, *Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease*. Nat Med, 2011. **17**(6): p. 673-5.
164. Zhao, J., J. Zhao, and S. Perlman, *Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN-gamma, IL-2 and IL-2R*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46241.
165. Goldstein, J.D., et al., *Role of cytokines in thymus- versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 155.
166. Piconese, S. and V. Barnaba, *Stability of Regulatory T Cells Undermined or Endorsed by Different Type-1 Cytokines*. Adv Exp Med Biol, 2015. **850**: p. 17-30.
167. Demydenko, D., *c-Cbl mediated ubiquitylation and regulation of cell surface exposure of CD5*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **392**(4): p. 500-4.
168. Moran, A.E., et al., *T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse*. J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1279-89.
169. Yamane, H. and W.E. Paul, *Cytokines of the gamma(c) family control CD4+ T cell differentiation and function*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1037-44.
170. Zheng, Y., et al., *A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway*. Blood, 2011. **118**(1): p. 156-66.
171. Piazza, F.A., et al., *Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1698-707.
172. Aparicio-Siegmund, S., et al., *Inhibition of protein kinase II (CK2) prevents induced signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/3 and constitutive STAT3 activation*. Oncotarget, 2014. **5**(8): p. 2131-48.


15 PUBLICACIONES

RESEARCH ARTICLE

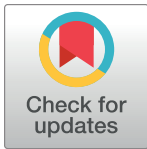
CD5 on dendritic cells regulates CD4+ and CD8+ T cell activation and induction of immune responses

Hui Li¹ , Erica Burgueño-Bucio² , Shin Xu¹, Shaonli Das¹, Roxana Olguin-Alor², Craig A. Elmetts¹, Mohammad Athar¹, Chander Raman^{3*}, Gloria Soldevila^{2*} , Hui Xu^{1*} 

1 Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, United States of America, **2** Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, **3** Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, United States of America

 These authors contributed equally to this work.

* xuhui@uab.edu (HX); soldevi@unam.mx (GS); chanderraman@uabmc.edu (CR)



OPEN ACCESS

Citation: Li H, Burgueño-Bucio E, Xu S, Das S, Olguin-Alor R, Elmetts CA, et al. (2019) CD5 on dendritic cells regulates CD4+ and CD8+ T cell activation and induction of immune responses. PLoS ONE 14(9): e0222301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301>

Editor: Jason R. Lees, Uniformed Services University of the Health Sciences F Edward Hebert School of Medicine, UNITED STATES

Received: March 15, 2019

Accepted: August 26, 2019

Published: September 6, 2019

Copyright: © 2019 Li et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by grants from the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, AR057163 (HX), AI1076562 (CR), National Multiple Sclerosis Society RG3891 (CR), and Conacyt (Grants #166024 and # 253274 to GS). E Burgueño-Bucio is a student of the Ph.D Program "Doctorado en Ciencias Biomédicas,

Abstract

The role of CD5 as a regulator of T cell signaling and tolerance is well recognized. Recent data show expression of CD5 on different subtypes of human dendritic cells, however its functional relevance in modulating DC mediated responses remains poorly understood. In this study, we show CD5 is expressed on CD11c+ DC from murine thymus, lymph node, spleen, skin and lung. Although the development of DC subpopulations in CD5^{-/-} mice was normal, CD5-deficient DC produced significantly higher levels of IL-12 than wild type DC in response to LPS. CD5^{-/-} DC, in comparison to CD5^{+/+} DC, enhanced the activation of CD4+ and CD8+ T cells *in vitro* and *in vivo* and induced significantly higher production of IL-2 and IFN-gamma by T cells. Consequently, CD5^{-/-} DC were significantly more potent than wild type DC in the induction of anti-tumor immunity and contact hypersensitivity responses in mice. Restoration of CD5 expression in CD5^{-/-} DC reduced IL-12 production and inhibited their capacity to stimulate T cells. Collectively, these data demonstrate that the specific expression of CD5 on DC inhibits the production of inflammatory cytokines and has a regulatory effect on their activity to stimulate T cells and induce immune responses. This study reveals a previously unrecognized regulatory role for CD5 on DC and provides novel insights into mechanisms for DC biology in immune responses.

Introduction

CD5 is a 67 kDa type 1 cell surface protein with a large cytoplasmic domain containing multiple potential phosphorylation sites that recruit regulators of T cell signaling [1, 2]. CD5 is expressed by thymocytes, mature T cells and the B1a subset of B cells [3]. CD5 regulates TCR signaling, tunes threshold for T cell activation during thymocyte development [4–7] and suppresses the activation of peripheral T cells through inhibition of TCR-proximal signaling in the immunological synapse [8, 9]. Increased CD5 expression on T cells is associated with a

Universidad Nacional Autónoma de México” and was supported by CONACYT (#513171). The research was also supported by UAB Comprehensive Cancer (P30 CA013148) and UAB Transgenic Animal Shared Facility (P30 AR48311). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

lower response to antigen stimulation and immunity [10–12]. A high expression of CD5 on T-cells is involved in the induction of tolerance and generation of Treg cells [13–16]. In contrast, lack of CD5 mediated signals in T cells leads to hyper-activation and increased activation induced cell death [17, 18]. Changes in CD5 expression also effects development and function of CD5+ B1a cells [19]. The function of CD5 in lymphocytes has been extensively studied, however, its role in other immune cell populations is largely unknown.

Dendritic cells (DC) depending on their state of differentiation and/or maturity play a central role in both induction and regulation of immune responses [20–25]. In an immune response, DC produce IL-12, a cytokine essential for Th1 differentiation and IL-23 that promotes stability and pathogenicity of Th17 cells [26, 27]. In a normal immune response, Th1 and Th17 have important roles in the protection against infectious diseases and cancers; however, dysregulation and loss of tolerance promotes their conversion to pathogenic autoreactive T cells [28–30]. Thus, the regulation of cytokine production by DC is necessary for homeostasis in immunity. Recent reports show that a subpopulation of human or rat dendritic cells (DC) express CD5 mRNA [31, 32]. In human, conventional DC type 2 (cDC2) from tonsils, lymph node (LN) and blood can be further classified on differential expression of CD5 [33]. T cell proliferation and cytokine production varies with expression levels of CD5 on human blood plasmacytoid DC (pDC) and human skin Langerhans and dermal DC [34, 35]. However, it remains unclear whether CD5 is only a marker for different DC subsets or it has a role in DC function.

In the current study, we characterized the expression of CD5 on murine DC in lymphoid and non-lymphoid organs and investigated whether CD5 regulates the function of DC in the activation and differentiation of T cells and in the induction of immune responses. We found that CD5 is commonly expressed on murine DC and has an inhibitory effect on the ability of DC to stimulate CD4 and CD8 T cells and to induce anti-tumor and contact hypersensitivity responses. CD5-dependent regulation of IL-12 production by DC is a mechanism for DC mediated regulation of T cells and immune responses.

Materials and methods

Mice

CD5^{-/-}, TCR transgenic OT-II and OT-I mice, wild-type (WT) C57BL/6 and ^{-/-} and WT Balb/c mice (Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and 2D2 mice [36] were used in this study. TCR transgenic OT-II and OT-I are specific for ovalbumin with restriction for MHCII and MHCI, respectively. 2D2 TCR transgenic TCR have MHCII restricted specificity for myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35–55 [36, 37]. Male and female mice were used. C57BL/6 and Balb/c mice were utilized in the study to enhance the rigor and to show that CD5 effects were not dependent on mouse strains. All animal procedures were performed according to National Institutes of Health guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Alabama at Birmingham and by the Animal Experimental Bio-Ethics Guidelines from the “Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)” of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Protocol #108).

Purification of DC from tissues and generation of bone marrow derived dendritic cells

Spleen (SP), lymph node (LN), thymus and lungs were digested with collagenase D (0.5mg/ml) and DNase (25U/ml) in 5% FCS RPMI media at 37°C for one hour. Tissues were mechanically

disaggregated. Shaved skin was removed and incubated in medium with dispase (25 mg/ml) at 37°C for 1–1.5 hours. Epidermis was peeled from the dermis and incubated in medium with 2.5% Trypsin, 1mM Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) and DNase (25 U/ml) at 37°C for 1.5 to 2 hours. The dermis was incubated in medium with collagenase D (0.5 mg/ml) and DNase (25 U/ml) at 37°C for 1 hour. Cell suspensions were used for staining and analysis of DC. CD11c⁺ DC from LN and SP were purified by using anti-CD11c antibody coupled MACS beads according to the manufacturer's instruction (Miltenyi Biotec., Auburn, CA). For *in vitro* stimulation of DC, CD11c⁺ DC were cultured for 24 hours in the presence or absence of 0.1 µg/ml Lipopolysaccharide [(LPS) Sigma, St. Louis, MO].

Bone marrow derived dendritic cells (BMDC) were generated from bone marrows of WT C57BL/6 and CD5^{-/-} mice as previously described [38]. Briefly, bone marrow cells were extracted from the femurs and tibias and cultured in 10% Fetal Calf Serum (FCS) RPMI1640 media supplemented with 10 ng/ml of recombinant Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [(GM-CSF) BD Bioscience] and 10 ng/ml IL-4 (Sigma) at 1x10⁶ cells/ml. LPS (1 µg/ml) was added to stimulate maturation of BMDC at day 5 and BMDC were harvested 24 hours later. Around 95% cells expressed DC marker CD11c.

Flow cytometry analysis

The analysis of DC and T cells by flow cytometry was conducted as described in our previous studies [39] and resident and migratory DC in SP and LN have been gated and analyzed as previously reported [40, 41]. Briefly, DC from SP and LN or BMDC were incubated with an anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2) to block non-specific binding and then stained with fluorescence labeled antibodies (BD Biosciences, BioLegend or eBioscience). All cell suspensions were stained with a viability dye (Zombie Aqua) to exclude dead cells.

For specific analysis of DC, a lineage cocktail was used to exclude T, B, natural killer (NK) and erythroid cells in analysis of DC (anti-CD3 PE (145-2C11), anti-CD19 PE (1D3), anti-NK PE (2B4), anti-TER119 PE (TER-119). DC subpopulations were identified by using anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418), anti-CD8α PE CY7 (53–6.7), anti-CD11b Violet Fluor 450 (M1/70), anti-CD103 biotin (2E7), anti-CD207 APC (eBioRMUL2), anti-CD5 Alexa Fluor 594 (53–7.3) and Streptavidin APC Cy7. Resident and migratory DC in SP and LN were analyzed as previously reported [38]. Lung cell suspensions were stained with the lineage cocktail (as before) and anti-Gr1 PerCP (RB6-8C) and anti-F4/80 APC (BM8) antibodies were used to discriminate macrophages. Also, lung DC were identified by using anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418) and anti-CD5 Alexa Fluor 594 (53–7.3). For BMDC, we used anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2), anti-B7-1 PE CY5 (16-10A1), anti-CD11c PE CY7 (N418), anti-B7-2 APC (GL-1), anti-CD40 PE (3/23), anti-CD274 PerCP eFluor710 (MIH5) and anti-CD197 PE CF594 (4B12). The cells were acquired in an Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) or in an Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with Flowjo Software (Tree Star Inc).

Cytokine production by DC

Purified CD11c⁺ SP DC were stimulated with LPS (1 µg/ml) and 24h later supernatants were harvested and IL-12 and IL-23 concentrations were detected by ELISA Ready-SET-Go kits (eBioscience, San Diego, CA).

Real-time PCR

The expression of mRNA was quantified by Real-time PCR (RT-PCR) as described previously [42]. Briefly, total RNA was isolated from homogenized skin tissues by using TRIzol Reagent

(GibcoBRL) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of RNA were used for synthesis of cDNA with a cDNA synthesis kit from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA). Real time PCR was performed with iQ SYBRO Green Supermix Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) in Fast Real-Time PCR System QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The expression level of cytokines was normalized to the house-keeping gene GAPDH in each sample and presented as relative level in data analysis.

The sequences for primers were as follows: IL-12p35, forward, 5' -CACAAGAACGAGAGTTGCC-3', reverse, 5' -TCAAGTCCTCATAGATGCTACC-3'. IL-12p40, forward: 5' -ACGGCAGCAGAATAAATATGAG-3', reverse, 5' -GGAGAAGTAGGAATGGGGAG-3'. IL-23p19, forward, 5' -AGATCTGAGAAGCAGGGAAC-3', reverse, 5' -TGCCACTGCTGACTAGAAC-3'. IL-6, forward, 5' -GCCTTCCCTACTTCACAAGTCC-3', reverse, 5' -TAGCCACTCCTTCTGTGACTCC-3'. IL-21, forward, 5' -TCATCATTTGACCTCGTGGCCC-3', reverse, 5' -ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCCC-3'. TGF- β 1, forward, 5' -ACCCTACTTCAGATCGTCC-3', reverse, 5' -ACAGTTCAATCCGCTGCTC-3'. IL-1 β , forward, 5' -CAAATCTCACAGCAGCAC-3', reverse, 5' -ACCGCTTTTCCATCTTCTTC-3'. IL-1 α , forward, 5' -TAGCACCTTACACCTACC-3', reverse, 5' -GCAACTCCTTCAGCAACAC-3'. TNF- α : forward, 5' -GAGCACAGAAAGCATGATCC-3', reverse, 5' -ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'. IL-4, forward, 5' -ACGGATGCGACAAAATCACC-3', reverse, 5' -ACCTTGGGAAGCCCTACAGAC-3'.

Assessment of DC-induced T cell activation

To examine DC induced T cell proliferation, CD4⁺ T cells were purified from transgenic mice (2D2) and labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). SP DC were purified from WT or CD5^{-/-} mice by anti-CD11c antibody coupled MACS beads and cultured with CFSE-labeled 2D2 T cells in the presence of MOG₃₅₋₅₅ peptide (2 μ g/ml) and four days later, the percent of dividing cells were analyzed by flow cytometry. In further experiments, OTII or OTI T cells were purified using anti-CD4 or anti-CD8 MicroBeads, respectively (Miltenyi Biotech., Auburn, CA) and were labeled with CFSE [17, 18]. OT-II or OT-I CFSE⁺ T cells (2 x 10⁶ cells/ml) were incubated with BMDC (5 x 10⁵/ml) in 96 well culture plates in the presence of 2 μ g/ml MHC class II peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) or 1 μ g/ml MHC class I peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) (AnaSpec, San Jose, CA), respectively [39]. Four days later, the percent of dividing cells were analyzed by flow cytometry.

To examine the ability of DC to stimulate T cells *in vivo*, CD5^{-/-} and WT BMDC were pulsed with the MHC class II or I peptides and injected subcutaneously in the footpad of WT mice (2 x 10⁶ cells/mouse). The mice were then injected intravenously with CFSE labeled OT-II or OT-I cells (6 x 10⁶ cells/mouse). The draining popliteal LN of the mice were harvested 4 days later and CFSE positive cells were analyzed for cell division by flow cytometry.

Examination of cytokine production by T cells

OT-II CD4⁺ T cells were purified and incubated with purified SP CD11c⁺ DC or BMDC in the presence of 2 μ g/ml MHC class II peptide as described above. T cell cultures without addition of any peptide served as controls. Supernatants were collected 4 days after cultures. Concentrations of IL-2, IL-17 and IFN- γ in supernatants were measured by ELISA as described [38].

To examine cytokine producing cells, T cells were harvested 4 days after the cultures and stimulated with PMA and ionomycin in the presence of a Golgi blocker for 4 hours as described [38]. Briefly, CD4⁺ T cells were gated and IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ producing

cells were analyzed by flow cytometry. Cytokine production by hapten-primed T cells was examined after isolation of primed T cells from the draining LN of mice that were sensitized with DNBS labeled WT or CD5^{-/-} SP DC. BMDC were labeled with DNBS and cultured with primed or control naïve T cells (2×10^6 T cells/ml and 2×10^5 DC/ml). Supernatants were harvested 48 hours after cultures and IL-2, IL-17 and IFN- γ were measured by ELISA as described [38].

Induction of anti-tumor immune responses by OVA-pulsed DC

WT and CD5^{-/-} BMDC (1×10^6 cells/ml) were pulsed with 100 μ g/ml OVA as described in our previous studies [39]. Mice were injected subcutaneously with OVA pulsed WT or CD5^{-/-}BMDC (2×10^6 cells/mouse in 200 μ l PBS). Seven days after the immunization, the mice were inoculated subcutaneously with mouse E.G7 tumor cells (4×10^6 cells/mouse). Tumor growth was monitored every 3 days in a double-blinded way. Tumor sizes were calculated with the formula: Tumor Size = $L \times S \times H \times \pi/6$ (L: long diameter, S: short diameter, H: height).

Contact hypersensitivity responses

Induction and measurement of Contact Hypersensitivity (CHS) responses were described previously [38]. In the current studies, BMDC or purified SP DC were labeled with 5mM of Dinitrobenzene Sulfonic Acid (DNBS, Sigma St. Louis, MO) at 37°C for 15 minutes. For sensitization of mice, hapten-labeled DC were injected subcutaneously in WT mice (1×10^6 DC/mouse). Five days after the sensitization, the mice were challenged with 0.2% DNFB on ear skin. Ear swelling was read 24 hours after the challenge in a double-blinded way. Mice which were not sensitized but challenged served as negative controls.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm Standard error (SEM). For all experiments the two-tailed Student's *t*-test was applied for statistical analysis with $p < 0.05$ being considered statistically significant.

Results

CD5 is expressed by CD11c⁺ DC in lymphoid and non-lymphoid tissues

We interrogated if CD5 was expressed on DC from SP, LN, thymus, lungs and skin from naïve C57BL/6 and Balb/c mice. Results showed that live Lin⁻/CD11c⁺/Ia/IE⁺ SP DC expressed CD5 with similar levels on CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subsets (Fig 1A). Similarly, CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ resident DC (Ia/IE^{low}/CD11c^{hi}) from lymph nodes expressed CD5. Migratory DC (Ia/IE^{hi}/CD11c^{low}) in lymph nodes, including Langerhans cells (CD207⁺/CD103⁻) and dermal DC subpopulations (CD11b⁺ DC, CD11b⁻DC and CD103⁺ DC) expressed detectable levels of CD5 which were lower than those of resident DC (Fig 1B). CD5 expression was also evident on thymic DC (Fig 1C). CD11c⁺ DC in non-lymphoid organs such as dermis expressed low levels of CD5 (Fig 1D). The epidermis contained too few DC to confidently detect CD5 expression (Fig 1D). In the lungs, a proportion of the Lin⁻/Gr-1⁻/F480⁻ DC (CD11c⁺ gated) expressed CD5 (Fig 1E). Collectively, the data indicate that CD5 is broadly expressed on DC in murine lymphoid and non-lymphoid tissues. Notably, migratory DC in LN represent a population derived from the skin and they express a lower level of CD5 than resident DC.

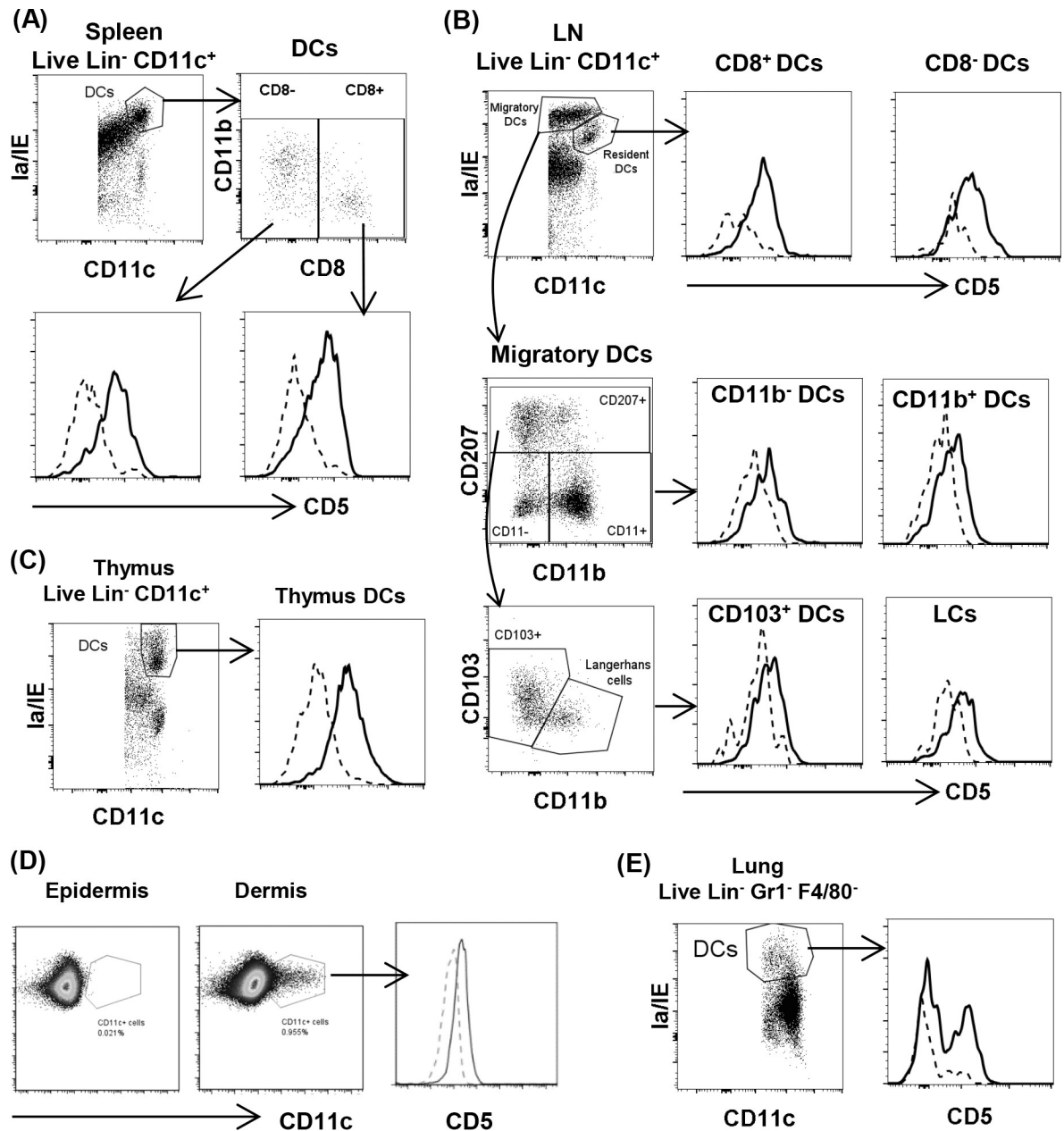


Fig 1. Expression of CD5 on dendritic cells. DC from various lymphoid and non-lymphoid organs are analyzed. In histograms, CD5 staining (solid line) is compared to fluorescence minus one (FMO) control (dashed line). (A) Gated SP DC (Lin-/CD11c+/Ia-IE+) express CD5. Both CD8 α + and CD8 α - subsets express a similar level of CD5. (B) Resident and migratory DC from LN are gated and analyzed. CD8 α + and CD8 α - resident DC express a higher level of CD5 than migratory DC which include four subpopulations (CD11b+, CD11b-, CD103+ and Langerhans CD207+/CD103-). (C) Gated thymus DC (Lin-/CD11c+/Ia-IE+) express CD5. (D) Dermal CD11c+ DC express CD5. Only few CD11c+ cells from the epidermal cells can be detected. (E) DC from the lung (Lin-/Gr1-/F4/80-/CD11c+/Ia/IE+) express CD5. The data are representative of 2–3 independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g001>

Outcome of CD5 deficiency in DC

We interrogated if development of DC was affected in CD5^{-/-} mice. We confirmed that CD5 was not expressed in CD5^{-/-} DC by assaying for CD5 mRNA and surface protein expression (S1 Fig). Results showed that CD5 deficiency did not alter the overall composition of DC as

well as resident and migratory DC subpopulations in SP and LN neither in percentages (Fig 2A and S2 Fig) nor in total cell numbers (S3 Fig). There was no significant difference between WT and CD5^{-/-} mice in the expression levels of CD40, Ia/IE, B7.1, B7.2, B7-H1 and B7-DC on SP DC (S1 Fig). We also did not find a significant change in the number and percentage of DC in lymphoid organs between WT and CD5^{-/-} mice, indicating that CD5 is not involved in DC development at homeostasis.

To determine if CD5 had an effect on the function of DC, BMDC generated from WT and CD5^{-/-} mice were stimulated with LPS for 24h and analyzed for expression levels of class II, costimulatory molecules (CD40, B7-1, B7-2), co-inhibitory molecules (B7-H1, B7-DC) and cytokines secreted by DC important for activation and differentiation of T cells. We observed no significant differences in expression of any cell surface molecule between CD5^{-/-} and WT BMDC (S1 Fig). CD5^{-/-} BMDC expressed significantly higher levels of IL-12p40, IL-12p35 and IL-23p19 mRNA than WT BMDC (Fig 2B). The expression levels of IL-6, IL-21, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-4 and TGF- β 1 mRNA was equivalent between CD5^{-/-} and WT BMDC (Fig 2B). To determine if BMDC data reflects primary DC, we stimulated purified DC from spleens of WT and CD5^{-/-} mice with LPS for 24 hours and cytokine production was measured by ELISA. Results showed that CD5^{-/-} SP DC produced significantly higher levels of IL-12 but not IL-23 than WT counterparts (Fig 2C). The expression of B7-1 and B7-2 on CD5^{-/-} SP DC was not significantly different from that on WT SP DC (S1 Fig). Overall, these results suggest that CD5 regulates IL-12 production with no significant effect on DC development and expansion.

CD5 deficiency in DC enhances their activity to stimulate T cells and induce immune responses

CD5 in T cells regulates T cell activation [4, 7, 9] and DC as antigen presenting cells have an essential function for the proliferation of T cells and induction of immune responses [20–23]. However, it has not been investigated whether CD5 expressed on murine DC has a role in modulating T cell activation. To address this question, BMDC generated from WT and CD5^{-/-} mice were pulsed with MHC class II or class I specific OVA peptides and co-cultured with OT-II or OT-I T cells. Results showed that CD5^{-/-} BMDC significantly promoted higher level of OT-II and OT-I T cell proliferation than WT BMDC (Fig 3A and 3B). We also found that purified SP DC from CD5^{-/-} mice induced a significantly higher level of MOG₃₅₋₅₅ peptide-specific 2D2 CD4⁺ T cell proliferation compared to WT SP DC (Fig 3C).

To determine if CD5 modulates DC-induced activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vivo*, naïve WT mice were injected subcutaneously with OVA peptide pulsed WT or CD5^{-/-} BMDC into the rear footpads, followed by intravenous injection with CFSE labeled OT-II or OT-I cells. The draining popliteal LN were harvested and the proliferation of CFSE-labeled T cells was analyzed by flow cytometry. Results showed that mice injected with CD5^{-/-} BMDC induced a significantly higher level of OT-I and OT-II T cell proliferation than those injected with WT BMDC, a result recapitulating *in vitro* cultures (Fig 3D).

Our results show that CD5 deficiency significantly upregulates the production of IL-12 by BMDC and SP DC compared to WT DC (Fig 2B and 2C), a cytokine necessary for the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into Th1 cells [43–45]. We therefore examined if CD5 in DC has a role in the differentiation of CD4⁺ Th1 and Th17 helper cells by co-culturing OT-II cells with OVA peptide-pulsed WT or CD5^{-/-} DC and the lineage specific cytokine production was measured by ELISA. Results showed that CD5^{-/-} DC induced significantly higher levels of Th1 cytokine IFN- γ and IL-2 than WT DC (Fig 4A), whereas IL-17 production was not significantly altered. Further experiments with intracellular cytokine staining supported an increase

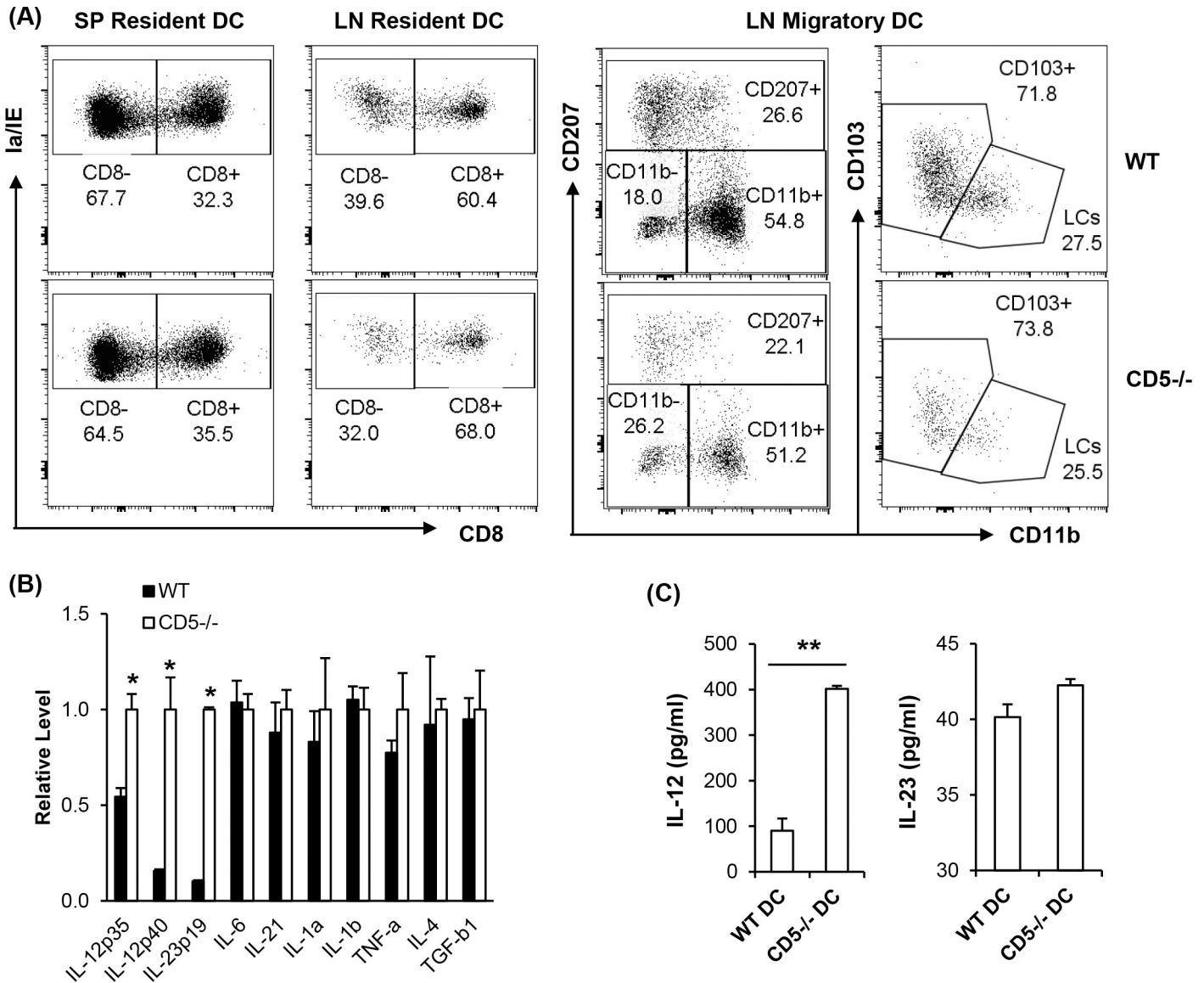


Fig 2. Effects of CD5 deficiency on DC. (A) DC from wild-type (WT) (upper panels) and CD5^{-/-} (bottom panels) mice are gated as described in the Fig 1 and resident and migratory DC populations are analyzed. The numbers in the graphs show the percentage of the indicated DC subsets. (B) CD5 deficiency alters cytokine production by BMDC. Levels of cytokine mRNA from WT and CD5^{-/-} BMDC are quantified by real time RT-PCR (n = 4, * P<0.05). (C) CD5 deficiency increases IL-12 production by DC. SP DC from WT and CD5^{-/-} were purified by CD11c coupled MACS beads and stimulated with LPS for 24 hours. Cytokine concentrations in culture supernatants were measured by ELISA (n = 3, **P<0.01). The data are representative of 2–3 independent experiments (two-tailed Student’s *t*-test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g002>

in IL-2 and IFN- γ , but not IL-4 or IL-17, producing T cells in the cultures with either BMDC or SP DC from CD5^{-/-} mice compared to those from WT mice (Fig 4B).

CD5 deficiency in DC enhances anti-tumor immunity

CD4⁺ Th1 and CD8⁺ T cells have major roles in anti-tumor immunity [46, 47]. To examine whether the enhanced ability of CD5^{-/-} DC to promote CD4⁺ Th1 and CD8⁺ T cells leads to more robust anti-tumor immune responses, naive mice were immunized subcutaneously with WT or CD5^{-/-} BMDC pulsed with OVA. Controls received no BMDC. The mice were then inoculated with EG.7 tumor cells (EL4 cells transfected with OVA gene). Results show tumor

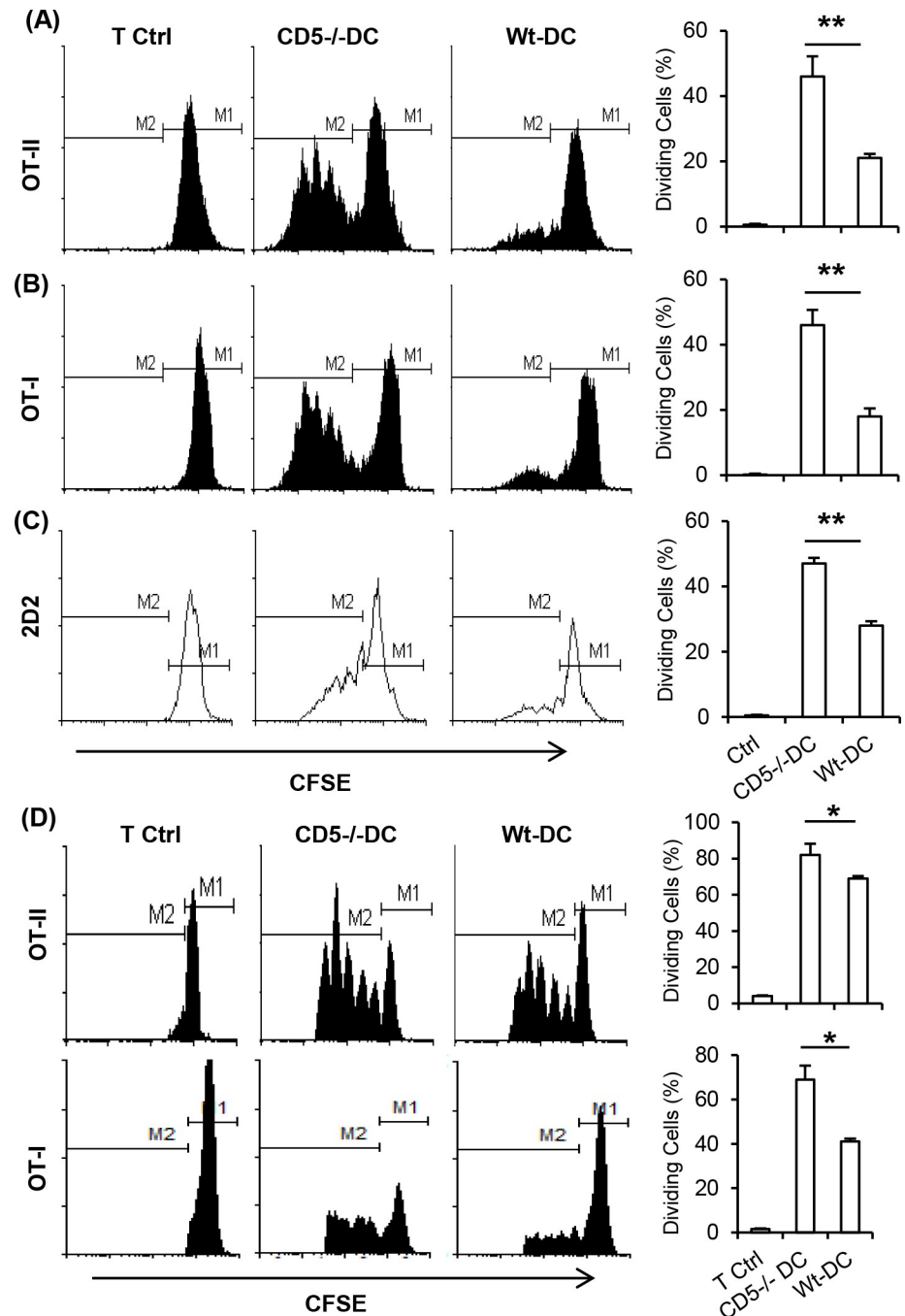


Fig 3. CD5 deficiency enhances the capacity of DC to activate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. OT-II (A) or OT-I (B) cells were cultured with OVA peptides pulsed BMDC. The cultures without OVA peptides served as controls (T Ctrl) (n = 5). (C) CD4⁺ T cells from 2D2 mice were stimulated with CD11c⁺ SP DC from WT or CD5^{-/-} mice in the presence of MOG₃₅₋₅₅ peptide (n = 5). (D) Naïve WT mice were injected subcutaneously with OVA peptides pulsed BMDC into rear footpads followed by intravenous injection of CFSE labeled OT-II or OT-I cells. Control mice received CFSE labeled T cells but no DC (Ctrl). The draining popliteal LN were analyzed (n = 6). The data are representative of 3–5 independent experiments (two-tailed Student's *t*-test, **P*<0.05, ***P*<0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g003>

size in mice immunized with OVA pulsed WT or CD5^{-/-} BMDC were significantly lower than controls; importantly, CD5^{-/-}DC were more potent than WT DC in the induction of anti-tumor

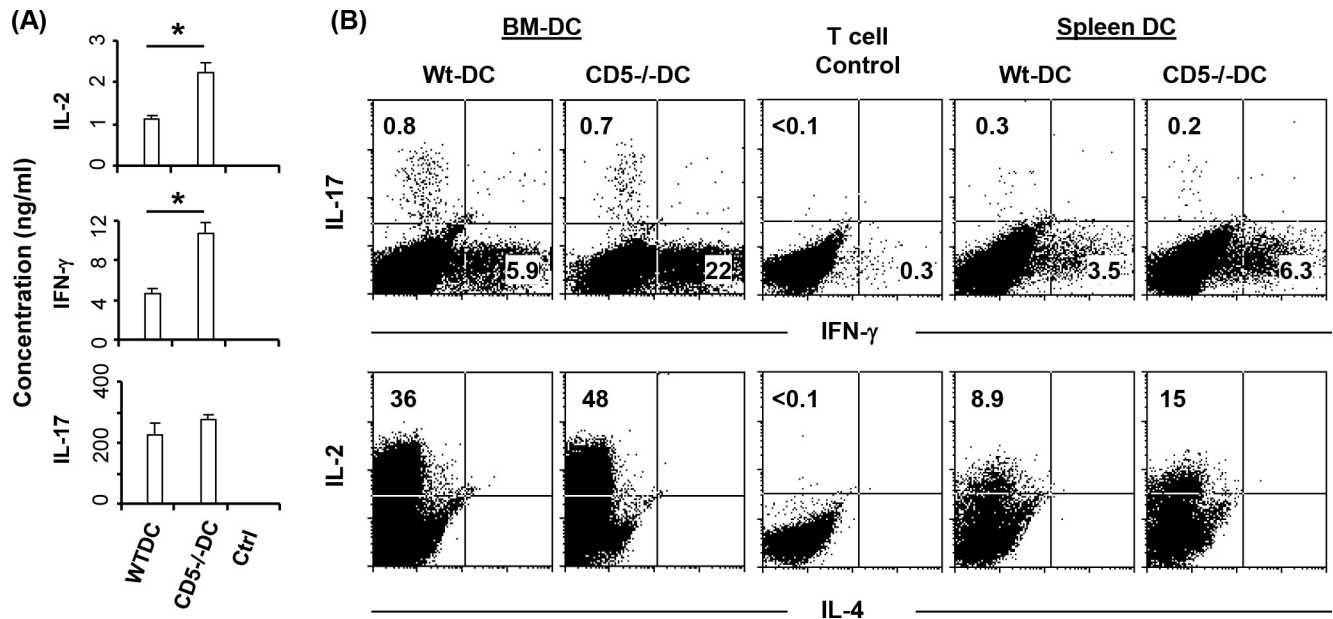


Fig 4. CD5 deficiency enhances the ability of DC to stimulate the production of Th1 cytokines by T cells. (A) BMDC were cultured with OT-II cells for 4 days in the presence of the OVA peptides. Control T cells (Ctrl) were cultured with BMDC which were not pulsed with OVA. Supernatants from T cell/DC cultures were harvested and cytokine concentrations were measured by ELISA ($n = 4$, $*P < 0.05$). UD: undetected. (B) Purified CD11c⁺ SP DC or BMDC were pulsed with OVA peptides and cultured with OT-II cells for 4 days. The percent of cytokine producing cells were detected by intracellular cytokine staining and analyzed by flow cytometry. The data are representative of 2–3 independent experiments (two-tailed Student's *t*-test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g004>

immunity (Fig 5). The tumor size in CD5^{-/-} BMDC immunized mice was less than the half of that in WT DC immunized mice at the indicated times of measurements. The results support a regulatory role for CD5 in DC in the context of proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and demonstrate that blockade of CD5 signals in DC enhances anti-tumor immune responses.

CD5 regulates contact hypersensitivity (CHS) responses

Our results reveal a specific role for CD5 in DC in regulating CD4 and CD8 proliferation and differentiation *in vitro* and *in vivo*. To further address this biology, we examined if CD5 on DC regulated the contact hypersensitivity (CHS) response which is a delayed type hypersensitivity mediated by Th1 and CD8⁺ T cells and requires IFN-γ [42, 48–52]. We sensitized naïve mice by a subcutaneous injection with purified WT and CD5^{-/-} SP DC labeled with hapten DNBS. The sensitized mice were then challenged with DNFB and CHS responses were measured. Results showed that CHS responses was significantly greater in mice sensitized with hapten-labeled SP DC from CD5^{-/-} mice than that with WT DC (Fig 6A, left panel). Similarly, hapten-labeled BMDC from CD5^{-/-} mice induced significantly greater CHS than WT BMDC (Fig 6A, right panel). T cells were isolated from the draining LN of mice sensitized with hapten-labeled WT or CD5^{-/-} SP DC and re-stimulated with hapten-labeled WT BMDC. Results showed that T cells from mice which were sensitized with CD5^{-/-} DC produced significantly higher levels of IFN-γ and IL-2, but not IL-17, than those from mice sensitized with WT DC (Fig 6B). This cytokine expression pattern recapitulates that of T cells stimulated with OVA pulsed WT or CD5^{-/-} DC (Fig 4A and 4B).

Re-expression of CD5 in CD5^{-/-} DC restores their ability to activate T cells

In the CD5^{-/-} mice, CD5 is absent from the onset of development. To exclude the possibility that our observations reflect an unrecognized developmental change in DC, we restored CD5

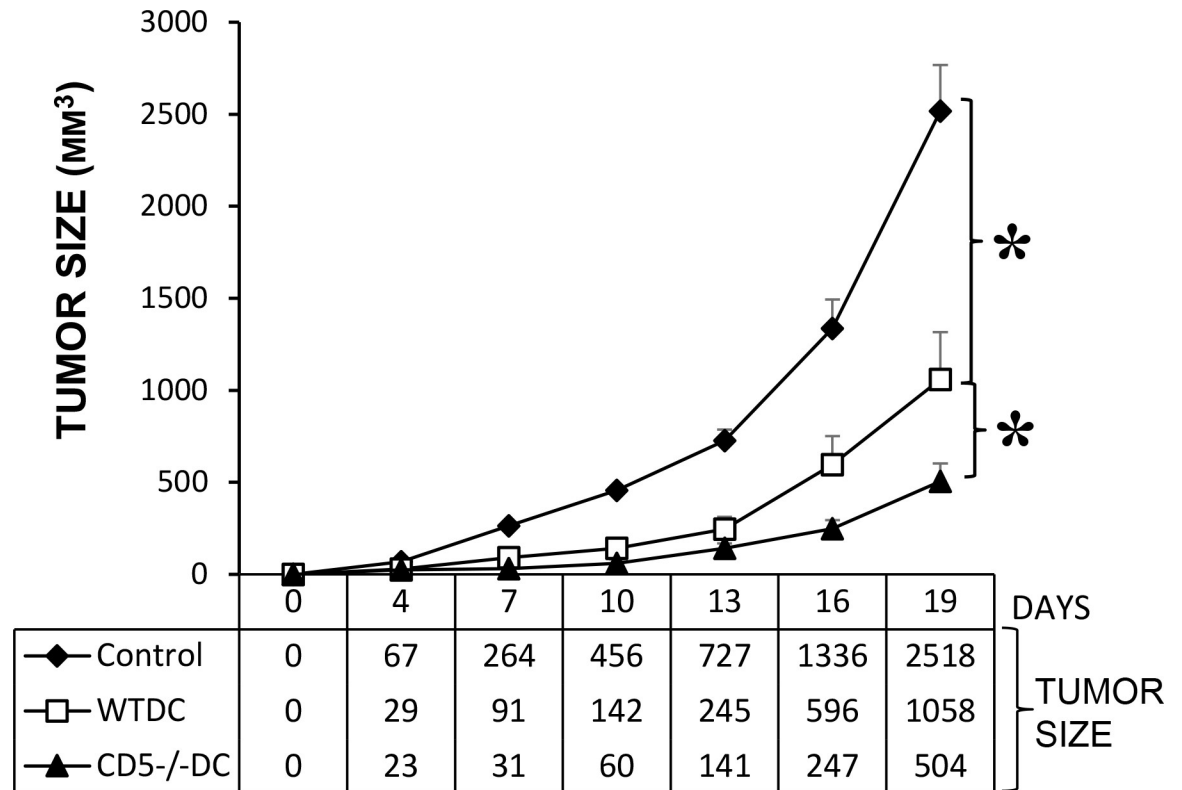


Fig 5. CD5^{-/-} DC are more potent than WT DC to induce anti-tumor immunity in animals. WT mice were immunized subcutaneously with OVA pulsed BMDC generated from WT or CD5^{-/-} mice. Control mice were not immunized. The mice were then inoculated subcutaneously with mouse EG.7 tumor cells. Tumor size was measured every 3 days (n = 5, *P<0.05). The data are presented as mean ± SEM and are representative of 2 independent experiments (two-tailed Student's *t*-test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g005>

expression in CD5^{-/-} BMDC using adenovirus encoding CD5 (Ad-CD5) or GFP (Ad-GFP). Infection with Ad-CD5 successfully restored the expression of CD5 in CD5^{-/-} BMDC to levels higher than endogenous CD5 on WT BMDC (Fig 7A). The ability of BMDC to regulate T cell responses were comparable to CD11c+ DC from SP, although they expressed lower levels of CD5 (Fig 1). Control Ad-GFP infected BMDC did not express any CD5 (Fig 7A). Ad-CD5 or Ad-GFP CD5^{-/-} infected BMDC were pulsed with OVA and cultured with OT-II or OT-I T cells. Results show that Ad-CD5 infected CD5^{-/-} BMDC induced proliferation of OT-II or OT-I T cells to levels equivalent to that by WT BMDC (Fig 7B). Ad-GFP infection had no effect; its ability to induce proliferation was as efficient as uninfected CD5^{-/-} BMDC and higher than WT BMDC (Fig 7B). CD5^{-/-} BM DC produced significantly higher levels of IL-12 and IL-23 than WT BMDC (Fig 7C). This is in accordance with the difference in the mRNA level of these cytokines in WT and CD5^{-/-} BMDC (Fig 2B). Restoration of CD5 expression in CD5^{-/-} BMDC significantly reduced the production of IL-12 and IL-23. Infection of CD5^{-/-} BMDC with Ad-GFP did not have a significant effect on cytokine production compared to control CD5^{-/-} BMDC (Fig 7C). To determine the effect of CD5 restoration on the function of DC in the induction of immune responses, Ad-CD5 and Ad-GFP infected DC were labeled with hapten DNBS and injected subcutaneously to sensitize naïve mice. We found that Ad-CD5 transfected CD5^{-/-} BMDC induced a significant lower level of CHS responses than Ad-GFP transfected CD5^{-/-} DC (Fig 7D). Collectively, the results indicate that the restoration of CD5 expression

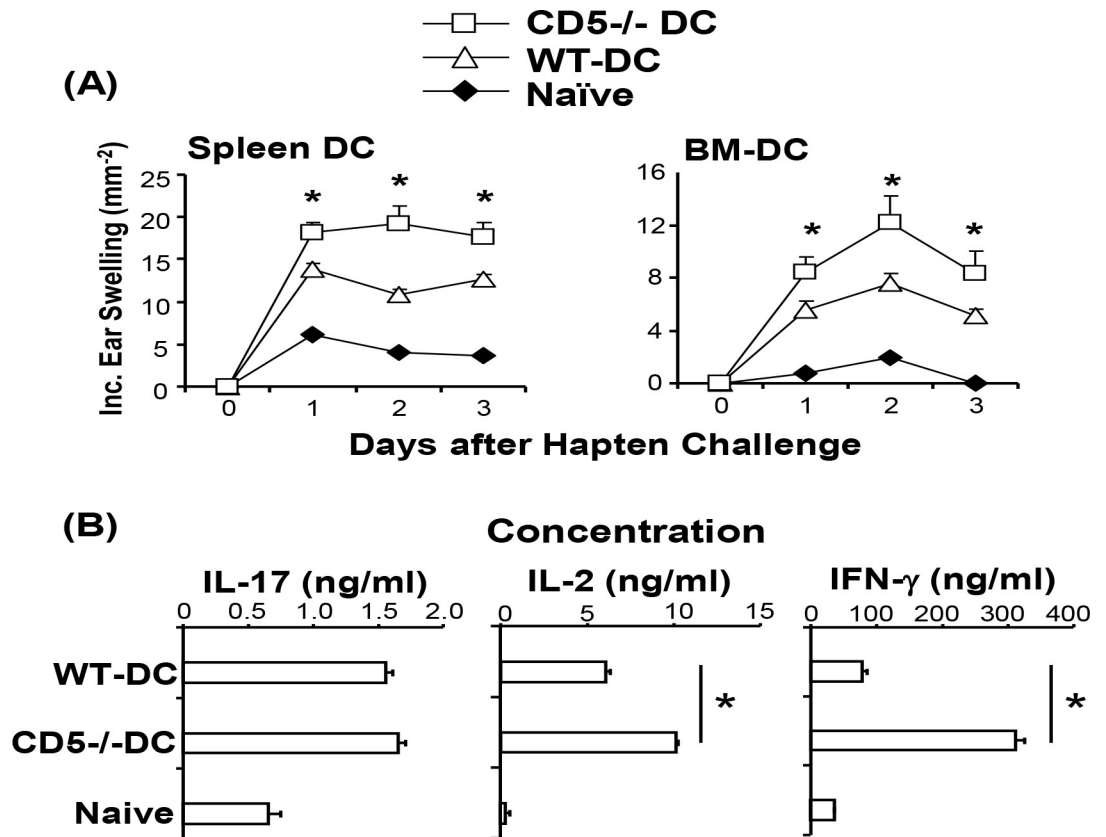


Fig 6. CD5^{-/-} DC enhance contact hypersensitivity responses (CHS). SP DC or BMDC from WT (WT-DC) or CD5^{-/-} (CD5^{-/-} DC) mice were pulsed with DNBS and injected subcutaneously in naïve mice. (A). Sensitized mice were challenged with DNFB and ear swelling was measured. Naïve mice which were not injected with DC but challenged with DNFB served as controls (n = 5, * P<0.05). (B) T cells from the draining LN of the immunized mice were stimulated with DNBS-pulsed WT BMDC. Cytokine concentrations were measured by ELISA. T cells from naïve mice served as controls (n = 4, * P<0.05). The data presented are mean ± SEM and are representative of 2–3 independent experiments (two-tailed Student's *t*-test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g006>

diminishes the activity of CD5^{-/-} DC to stimulate T cell proliferation, produce IL-12 and IL-23 and to induce immune responses.

Discussion

The role of CD5 in the regulation of T cell activation and tolerance has been extensively studied [7–9]. Our finding has revealed a previously unrecognized function for CD5 in regulation of DC functions and added new insights into CD5 mediated effects on immune responses.

It was not well examined whether murine DC are able to express CD5, although a few reports show that human and rat DC express CD5 mRNA [31, 32]. DC from human tonsil and lymph nodes express CD5 and blood cDC2 (HLA-DR+/CD11+/CD1c+) have CD5^{hi} and CD5^{low} subsets [33]. Subpopulations of human blood pDC, epidermal LC (CD1a^{hi}/Langerin+) and dermal DC (HLA-DR+/CD1a^{dim}) also express CD5 [34, 35]. The results from this study demonstrate that the expression of CD5 is a common feature of murine DC. We show that CD5 is expressed by Lin-/CD11c+/Ia/IE+ DC in lymphoid organs, dermis and lungs. CD8α+ and CD8α- DC subsets (Ia/IE^{low}/CD11c^{hi}) from SP and LN express a higher level of CD5 than migratory LN DC (Ia/IE^{hi}/CD11c^{low}) represented by Langerhans cells (CD207+/CD103-) and dermal DC (CD11b+ DC, CD11b-DC and CD103+ DC). The lower

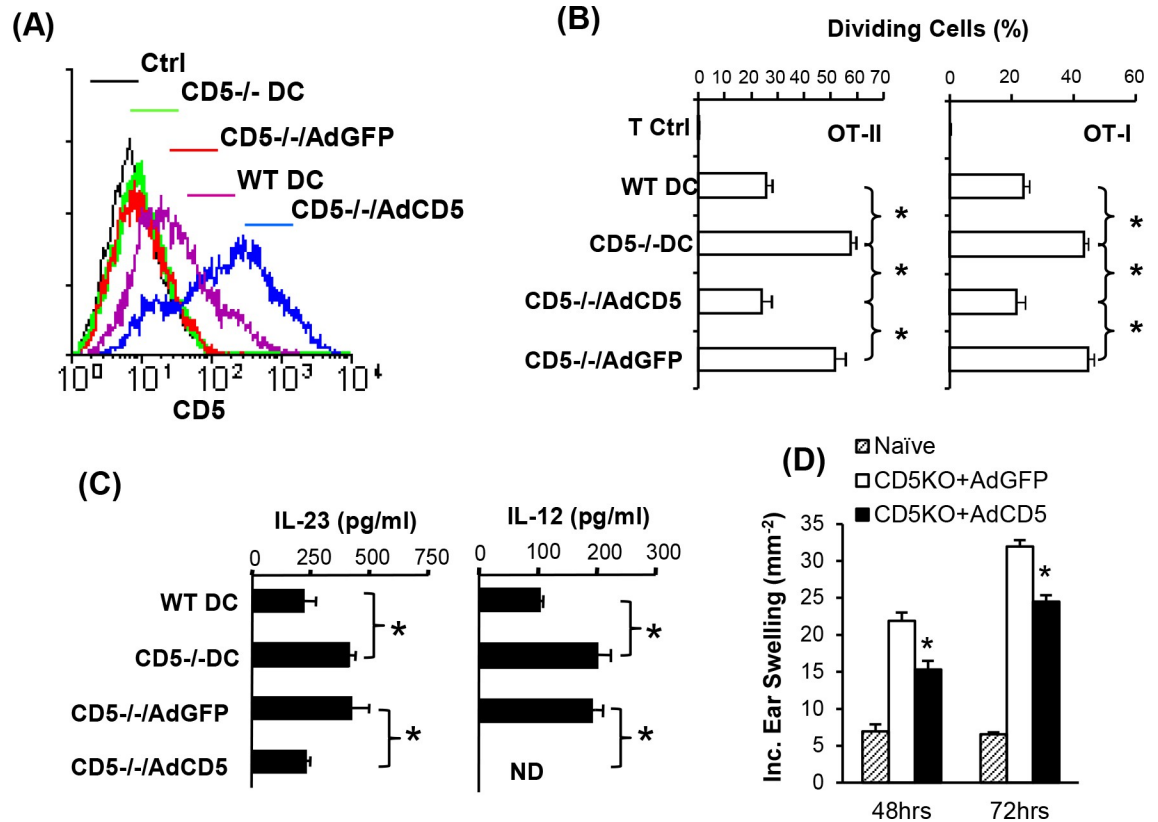


Fig 7. Re-expression of CD5 restores regulatory activity to CD5^{-/-} DC. (A). Restoration of CD5 in CD5^{-/-} BMDC transfected with Ad-GFP (CD5^{-/-}/AdGFP) or Ad-CD5 (CD5^{-/-}/AdCD5). Ctrl: Isotype-matched IgG control. (B). The restoration of CD5 diminishes the activity of CD5^{-/-} DC to stimulate proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. T cell control (T Ctrl) was cultured without DC (n = 4). (C) The re-expression of CD5 expression inhibits cytokine production by CD5^{-/-} DC (n = 4). Note that IL-12 was below the detectable level (UD) in the CD5^{-/-}/AdCD5 group. (D) The re-expression of CD5 expression attenuates the ability of CD5^{-/-} DC to induce CHS responses (n = 6). The data are presented as mean ± SEM and are representative of 2–3 independent experiments (two-tailed Student's *t*-test, *P<0.05, ** P<0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301.g007>

expression of CD5 on DC from peripheral non-lymphoid organs supports the concept that tissue resident DC are CD5^{lo}. These findings were common to both C57BL/6 and Balb/c mice, indicating that it is not restricted to certain mouse strains. Human DC generated from human CD34⁺ hematopoietic progenitors in cultures express a low level of CD5 [35]. Similarly, murine BMDC in this study, a population that may include a small proportion of monocyte-derived macrophages [53], expressed a low level of CD5.

Collectively, our study and reports from human studies demonstrate that DC from lymphoid organs and non-lymphoid organs express CD5 although the expression pattern is not identical.

CD5 is not necessary for the development DC subpopulations *in vivo* or generation of BMDC. However, CD5 does regulate the production of IL-12 in BMDC and SP DC (Figs 2B, 2C and 7C). Literature well demonstrates that IL-12 promotes T cell proliferation [54, 55] and is necessary for differentiation of naïve CD4 T cells to Th1 cells which produce IL-2 and IFN-γ [43–45]. We show that CD5^{-/-} DC induce significantly higher levels of Th1 cell differentiation than WT DC. Moreover, CD5^{-/-} DC promote greater CD4 and CD8 T cell proliferation than WT DC *in vitro* and *in vivo*, probably attributable to differences in IL-12 secretion. The transfer of peptide pulsed CD5^{-/-} DC induces a significantly higher proliferation of T cells in LN

than WT DC. It is not excluded that the transfer of peptide from migratory DC to lymph node resident DC in the recipient mice might occur in the experiments as reported [56, 57]. However, it may not contradict the increased activity of CD5^{-/-} DC since the recipient mice were wild type mice and wild type DC were less potent than CD5^{-/-} DC to induce proliferation of T cells. The increase in IL-23 production by CD5^{-/-} BMDC but not by CD5^{-/-} SP DC compared to their WT counterparts probably represents differences between *in vitro* and *in vivo* DC. However, both BMDC and SP DC from CD5^{-/-} mice induce a higher level of Th1 cells than their WT counterparts *in vitro* and *in vivo*, indicating that the increase of IL-12 by CD5^{-/-} DC may be a key mechanism for the enhancement of T cell activation and Th1 cell development. Taken together, the regulation of IL-12 has a key role in CD5 mediated effects on DC activity to activate T cells and to induce immune responses.

In human, CD5 expression levels on DC correlates directly with ability to stimulate T cell proliferation which is opposite to our findings in mice [33–35]. Multiple-factors can explain this apparent discordance with our findings with DC from CD5^{-/-} mice. These include the role of DC in allogeneic T cell responses (human studies) vs TCR-dependent T cell responses (this study) and the possibility that CD5⁺ and CD5⁻ or CD5^{low} DC may represent two different DC subsets which also differ in other features such as maturation and activation (human studies). In fact, human blood CD5^{low} DC induce a higher level of IFN- γ + T cells [33] whereas human skin CD5⁻ DC induce a lower level of IFN- γ + T cells [35] than their CD5⁺ counterparts. However, in both studies, CD5⁺ DC induce a higher level of T cell proliferation than CD5⁻ or CD5^{low} DC. Nevertheless, mechanisms for the increased IFN- γ producing T cells induced by CD5^{low} or CD5⁻ DC (human studies) remain to be elucidated. In our studies, we show that knockout of CD5 enhances the activity of DC to stimulate T cell proliferation, and importantly, to induce immune responses in two animal models. Moreover, we show that CD5 deficiency in DC increases IL-12 production and consequently enhances Th1 cell development. Importantly, these effects are reversed by restoration of CD5 expression in CD5^{-/-} DC. Interestingly, over expression of CD5 in the CD5^{-/-} DC resulted in undetectable levels of IL-12, implicating that production of this cytokine is regulated by CD5 expression levels (Fig 7C). This observation reflects the biological relevance of CD5 expression levels in some immunological settings previously reported in literature [58]. Altogether, the composite data indicate that the ability of DC to stimulate T cell responses depends not only on CD5 expression levels but also on the nature of specific DC subsets.

Th1 and CD8+ T cells play a central role in immune responses against tumors [46, 47]. DC based immune therapy that enhance Th1 and CD8+ T cell immune responses has been successfully applied in treatment of cancer patients [59, 60]. However, improvement in efficiency of this approach is highly desired. Our data demonstrate that CD5^{-/-} DC are more effective than WT DC in the induction of immune responses in tumor and CHS models indicating a regulatory role for CD5 in DC. This gain in activity is directly attributable to the absence of CD5 since reconstitution of CD5 expression in DC restored CHS responses to that of WT DC. Our study presents a novel strategy where blockade of CD5 in DC to increase the production of IL-12 and enhance Th1 and CD8+ T cell responses can be harnessed for immune therapy against tumors.

The molecular mechanism underlying CD5-dependent regulation of DC function observed in this study needs further investigations. Domains within CD5 cytoplasmic tail previously shown to be important in regulation of T cell activation and differentiation such as CK2 binding and ITIM-like domains may have similar function in DC. Homotypic CD5-CD5 interactions, as suggested in previous studies in T cells [61], may also explain how DC regulates T cell proliferation. However, the regulation of IL-12 production is specific for CD5 mediated effects in DC.

Conclusions

In summary, the current study demonstrates that CD5 regulates the activity of DC to induce T cell proliferation and immune responses. CD5 deficiency enhances the ability of DC to activate CD4⁺ and CD8⁺ T cells and promote Th1 cell differentiation. CD5^{-/-} DC are more potent than WT DC in the induction of anti-tumor immunity and CHS responses. CD5 has an inhibitory effect on IL-12 production by DC. Our study reveals a previously unknown biology of CD5 on DC activity and elucidates a novel mechanism for DC mediated immune responses in inflammatory diseases.

Supporting information

S1 Fig. Effects of CD5 deficiency on DC phenotype.

(TIF)

S2 Fig. CD5 deficiency does not have a significant effect on DC composition.

(TIF)

S3 Fig. CD5 deficiency does not have a significant effect on the total numbers of DC population.

(TIF)

Acknowledgments

We thank the Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo UNAM, Mexico, for technical help in acquisition and sorting experiments.

Author Contributions

Conceptualization: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Data curation: Hui Li, Erica Burgueño-Bucio, Shin Xu, Shaonli Das, Roxana Olguin-Alor, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Formal analysis: Erica Burgueño-Bucio, Craig A. Elmetts, Mohammad Athar, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Funding acquisition: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Investigation: Hui Li, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Methodology: Hui Li, Erica Burgueño-Bucio, Shin Xu, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Project administration: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Resources: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Software: Hui Xu.

Supervision: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Validation: Shin Xu, Shaonli Das, Roxana Olguin-Alor, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Visualization: Hui Xu.

Writing – original draft: Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

Writing – review & editing: Craig A. Elmetts, Mohammad Athar, Chander Raman, Gloria Soldevila, Hui Xu.

References

1. Burgueno-Bucio E, Mier-Aguilar CA, Soldevila G. The multiple faces of CD5. *J Leukoc Biol.* 2019. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R> PMID: 30676652.
2. Soldevila G, Raman C, Lozano F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(3):310–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.003> PMID: 21482089; PubMed Central PMCID: PMC3109098.
3. Huang HJ, Jones NH, Strominger JL, Herzenberg LA. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(1):204–8. PubMed <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.204> PMID: 3025855; PubMed Central PMCID: PMC304171.
4. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Killeen N, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science.* 1995; 269(5223):535–7. PubMed <https://doi.org/10.1126/science.7542801> PMID: 7542801.
5. Azzam HS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med.* 1998; 188(12):2301–11. PubMed <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2301> PMID: 9858516; PubMed Central PMCID: PMC2212429.
6. Azzam HS, DeJarnette JB, Huang K, Emmons R, Park CS, Sommers CL, et al. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol.* 2001; 166(9):5464–72. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5464> PMID: 11313384.
7. Pena-Rossi C, Zuckerman LA, Strong J, Kwan J, Ferris W, Chan S, et al. Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J Immunol.* 1999; 163(12):6494–501. PubMed PMID: 10586041.
8. Raman C. CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res.* 2002; 26(1–3):255–63. <https://doi.org/10.1385/IR:26:1-3:255> PMID: 12403363.
9. Brossard C, Semichon M, Trautmann A, Bismuth G. CD5 inhibits signaling at the immunological synapse without impairing its formation. *J Immunol.* 2003; 170(9):4623–9. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4623> PMID: 12707340.
10. Hawiger D, Masilamani RF, Bettelli E, Kuchroo VK, Nussenzweig MC. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity.* 2004; 20(6):695–705. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.002> PMID: 15189735.
11. Stamou P, de Jersey J, Carmignac D, Mamalaki C, Kioussis D, Stockinger B. Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells. *J Immunol.* 2003; 171(3):1278–84. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1278> PMID: 12874216.
12. Dorothee G, Vergnon I, El Hage F, Le Maux Chansac B, Ferrand V, Lecluse Y, et al. In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity. *J Immunol.* 2005; 174(11):6888–97. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6888> PMID: 15905531.
13. Ordonez-Rueda D, Lozano F, Sarukhan A, Raman C, Garcia-Zepeda EA, Soldevila G. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol.* 2009; 39(8):2233–47. <https://doi.org/10.1002/eji.200839053> PMID: 19609976.
14. Henderson JG, Opejin A, Jones A, Gross C, Hawiger D. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity.* 2015; 42(3):471–83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.010> PMID: 25786177.
15. Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med.* 2003; 197(4):451–60. PubMed <https://doi.org/10.1084/jem.20021387> PMID: 12591903; PubMed Central PMCID: PMC2193859.
16. Kassiotis G, Zamoyska R, Stockinger B. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J Exp Med.* 2003; 197(8):1007–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20021812> PMID: 12707300; PubMed Central PMCID: PMC2193871.
17. Axtell RC, Webb MS, Barnum SR, Raman C. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J Immunol.* 2004; 173(5):2928–32. PubMed PMID: 15322150.
18. Axtell RC, Xu L, Barnum SR, Raman C. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of

- IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J Immunol.* 2006; 177(12):8542–9. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8542> PMID: 17142752; PubMed Central PMCID: PMC2744950.
19. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:595–621. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.595> PMID: 11244048.
 20. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:685–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040> PMID: 12615891.
 21. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 2001; 106(3):259–62. PubMed [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00456-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00456-1) PMID: 11509173.
 22. Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13(3):291–8. PubMed PMID: 11406360.
 23. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767> PMID: 10837075.
 24. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:47–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.47> PMID: 11244030.
 25. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(6):377–91. <https://doi.org/10.1038/nri3667> PMID: 24830344; PubMed Central PMCID: PMC4757912.
 26. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21(4):467–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.018> PMID: 15485625.
 27. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(4):248–56. <https://doi.org/10.1038/nri2742> PMID: 20336152; PubMed Central PMCID: PMC3242804.
 28. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:821–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557> PMID: 17201677.
 29. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008; 453(7198):1051–7. <https://doi.org/10.1038/nature07036> PMID: 18563156.
 30. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7):479–89. <https://doi.org/10.1038/nri2800> PMID: 20559326.
 31. De Bernardis F, Lucciarini R, Boccanera M, Amantini C, Arancia S, Morrone S, et al. Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun.* 2006; 74(7):4282–94. <https://doi.org/10.1128/IAI.01714-05> PMID: 16790803; PubMed Central PMCID: PMC1489681.
 32. Wood GS, Freudenthal PS. CD5 monoclonal antibodies react with human peripheral blood dendritic cells. *Am J Pathol.* 1992; 141(4):789–95. PubMed PMID: 1384337; PubMed Central PMCID: PMC1886626.
 33. Yin X, Yu H, Jin X, Li J, Guo H, Shi Q, et al. Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J Immunol.* 2017; 198(4):1553–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600193> PMID: 28087664.
 34. Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, Zhang X, Choi O, Tolentino LL, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(8):1988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610630114> PMID: 28167780; PubMed Central PMCID: PMC5338447.
 35. Korenfeld D, Gorvel L, Munk A, Man J, Schaffer A, Tung T, et al. A type of human skin dendritic cell marked by CD5 is associated with the development of inflammatory skin disease. *JCI Insight.* 2017; 2(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96101> PMID: 28931765; PubMed Central PMCID: PMC5621884.
 36. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 2003; 197(9):1073–81. <https://doi.org/10.1084/jem.20021603> PMID: 12732654; PubMed Central PMCID: PMC2193967.
 37. Sestero CM, McGuire DJ, De Sarno P, Brantley EC, Soldevila G, Axtell RC, et al. CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *J Immunol.* 2012; 189(6):2918–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200065> PMID: 22904299; PubMed Central PMCID: PMC3436980.
 38. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol.* 2006; 177(10):6852–8. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6852> PMID: 17082599; PubMed Central PMCID: PMC3179908.

39. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2010; 184(5):2281–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902574> PMID: 20118280; PubMed Central PMCID: PMC3179912.
40. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*. 2013; 123(2):844–54. <https://doi.org/10.1172/JCI65260> PMID: 23298832; PubMed Central PMCID: PMC3561796.
41. Olguin-Alor R, de la Fuente-Granada M, Bonifaz LC, Antonio-Herrera L, Garcia-Zepeda EA, Soldevila G. A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function. *PLoS One*. 2016; 11(12): e0167813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167813> PMID: 27936218; PubMed Central PMCID: PMC5147992.
42. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J Immunol*. 2009; 183(2):1463–70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804108> PMID: 19553527; PubMed Central PMCID: PMC3179907.
43. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(7):521–31. <https://doi.org/10.1038/nri1648> PMID: 15999093.
44. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 2001; 292(5523):1907–10. <https://doi.org/10.1126/science.1059835> PMID: 11397944.
45. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*. 2007; 8(4):369–77. <https://doi.org/10.1038/ni1449> PMID: 17351619.
46. Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013; 494(7437):361–5. <https://doi.org/10.1038/nature11824> PMID: 23376950.
47. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 anti-tumor responses. *J Immunol*. 2004; 172(3):1380–90. PubMed <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1380> PMID: 14734713.
48. Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, Saint-Mezard P, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2005; 1(1):75–86. <https://doi.org/10.1586/1744666X.1.1.75> PMID: 20477656.
49. Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*. 2002; 46(1):1–5. PubMed <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.460101.x> PMID: 11918579.
50. Gorbachev AV, Fairchild RL. Regulatory role of CD4+ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res*. 2001; 24(1):69–77. <https://doi.org/10.1385/IR:24:1:69> PMID: 11485210.
51. Xu H, Bjarnason B, Elmets CA. Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: potential differences at cellular and molecular levels. *Am J Contact Dermat*. 2000; 11(4):228–34. <https://doi.org/10.1053/ajcd.2000.8009> PMID: 11123416.
52. Peiser M. Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013:261037. <https://doi.org/10.1155/2013/261037> PMID: 24023564; PubMed Central PMCID: PMC3759281.
53. Helft J, Bottcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*. 2015; 42(6):1197–211. Epub 2015/06/18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018> PMID: 26084029.
54. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol*. 1991; 147(3):874–82. PubMed PMID: 1713608.
55. Yanagida T, Kato T, Igarashi O, Inoue T, Nariuchi H. Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2R expression of T helper cell-1 clone. *J Immunol*. 1994; 152(10):4919–28. PubMed PMID: 7909827.
56. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity*. 2008; 29(5):795–806. Epub 2008/10/28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.013> PMID: 18951047; PubMed Central PMCID: PMC2746692.

57. Mueller SN. Spreading the load: Antigen transfer between migratory and lymph node-resident dendritic cells promotes T-cell priming. *Eur J Immunol.* 2017; 47(10):1798–801. Epub 2017/08/29. <https://doi.org/10.1002/eji.201747248> PMID: 28845904.
58. Burgueno-Bucio E, Mier-Aguilar CA, Soldevila G. The multiple faces of CD5. *J Leukoc Biol.* 2019; 105(5):891–904. Epub 2019/01/25. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R> PMID: 30676652.
59. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2014; 15(7):e257–67. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70585-0) PMID: 24872109.
60. Homey B, Muller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(3):175–84. <https://doi.org/10.1038/nri748> PMID: 11913068.
61. Brown M. H., Lacey E. Aligand for CD5 is CD5. *J Immunol.* 2010; 185(10):6068–6074. Epub 2010/10/15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903823> PMID: 20952682.

REVIEW

The multiple faces of CD5

Erica Burgueño-Bucio | Carlos A. Mier-Aguilar* | Gloria Soldevila

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Correspondence

Gloria Soldevila, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México.
Email: soldevi@unam.mx

*Current affiliation: Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México City, México.

Abstract

Since its discovery, over 30 years ago, CD5 has been used as a marker to identify T cells, B1-a cells, and B cell chronic lymphocytic leukemia cells. Throughout the years, many studies have described the functional relevance of CD5 as a modulator of T and B cell receptor signaling. However, it has not been until recent years that CD5 has emerged as a functional receptor in other areas of the immune system. Here, we review some of the most important aspects of CD5 as a modulator of TCR and BCR signaling, cell survival receptor both in T and B cells during health and disease, as well as the newly discovered roles of this receptor in thymocyte selection, T cell effector differentiation, and immune tolerance. CD5 was found to promote T cell survival by protecting autoreactive T cell from activation-induced cell death, to promote de novo induction of regulatory T cells in the periphery, to modulate Th17 and Th2 differentiation, and to modulate immune responses by modulating dendritic cell functions. CD5 is overexpressed in Tregs and Bregs, which are fundamental to maintain immune homeostasis. The newly established roles of CD5 in modulating different aspects of immune responses identify this receptor as an immune checkpoint modulator, and therefore it could be used as a target for immune intervention in different pathologies such as cancer, autoimmune diseases or infections.

KEYWORDS

apoptosis, B lymphocytes, signal transduction, T cell responses, T lymphocytes, thymus, tolerance/suppression/anergy

1 | INTRODUCTION

CD5 is a T cell, B1-a cell, and B-CLL receptor first described over 30 years ago that has been used as surface marker to identify both human and murine cell populations.^{1,2} However, it was not until the mid-1980s and early 1990s that molecular and functional studies about the role of CD5 were performed.

This receptor was reported both as a positive and negative regulator of T cell receptor (TCR) signaling and as a negative regulator of BCR signaling (reviewed in Ref. 3). More recent studies have shown

a major role of this receptor in regulating cell survival in these cells. Nevertheless, several interrogations about the role of CD5 in modulating these and other immune processes remained unanswered. Here, we review the most relevant findings that have provided new insights into CD5 biology and its functional relevance in the immune system.

2 | CD5 GENERAL REMARKS

CD5 (Leu-1) is a member of the SRCR family, which was initially described as a cell surface marker in human T cells and B-CLL cells using OKT1 antibodies.² Its expression was also reported in mouse T cells using anti-Lyt-1 antibodies and was shown mainly in thymocytes and mature T cells.⁴ Later studies in humans showed that CD5 is also expressed in human fetal lymph nodes, specifically in a B cell population that appears to be different from the one generated in bone marrow.⁵ In mice, it was shown that CD5 can define the B1-a cell subpopulation whereas in human B cells the expression of this receptor has also been observed in cord blood and peripheral B cells in

Abbreviations: AICD, activation induced cell death; AKT, protein kinase B; B-CLL, B cell chronic lymphocytic leukemia; CD, cluster of differentiation; cDC, conventional DC; CK2, casein kinase 2; DAG, diacyl glycerol; DC, dendritic cell; DN, double negative; DP, double positive; EAE, experimental autoimmune encephalitis; gp, glycoprotein; GSK3, glycogen synthase kinase 3; IgVH, immunoglobulin variable heavy chain; mAb, monoclonal antibody; PC-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase; pDC, plasmacytoid DC; pERK, phosphorylated ERK; PI3K, phosphatidylinositol 3 Kinase; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; pMHC, Major histocompatibility complex with associated peptide; ROR γ t, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor γ t; S, serine; SRCR, scavenger receptor cysteine rich; WT, wild type; Y, tyrosine

children and also low CD5 levels have been observed in almost every B cell subset in adults.⁶⁻⁸

Recently, it has been reported that human cDC2 in tonsils, lymph nodes (LN), and blood as well as skin Langerhans and dermal DCs and blood pDCs can be further subdivided into CD5 positive and negative subpopulations, demonstrating for the first time that some human DCs express CD5.⁹⁻¹¹ In this context, it has been observed that CD5 is also expressed in DCs in mice (Burgueño-Bucio et al., unpublished data). The expression of CD5 in DCs might have some important consequences in the immune system; some of which will be later discussed.

3 | REGULATION OF CD5 EXPRESSION

To understand the functional relevance of CD5 expression on different immune cells, it is important to investigate how CD5 expression is regulated. It is known that CD5 levels differ between T cell subtypes and also B1-a cells. In T cells, levels of surface CD5 are differentially expressed as follows: thymic CD4+ > splenic CD4+ > thymic CD8+ > splenic CD8+ > thymic DP, with B1-a cells showing lower levels than DP thymocytes. In this context, the hierarchy of CD5 expression was shown to correlate with TCR-signaling strength at specific developmental checkpoints during T cell development.¹²

Despite human, murine, and avian CD5 genes were first cloned during the 1980s and 1990s,¹³⁻¹⁵ it was not until the 2000s that modulation of CD5 expression was better understood. Molecular characterization of the murine CD5 gene showed that its promoter region contains three potential transcription factor-binding sites: the CCAAT, κ E2, and E26 transformation specific (ETS), transcription site. Further characterization of these sites showed the ETS-binding region as an important site for the binding of the ETS-1 protein, and that deletion of this site results in an important reduction of CD5 expression. Additional to this region, two sites surrounding the ETS-binding domain, denominated CD5X and CD5Y, were identified as important modulators of CD5 full expression. It was shown that CD5Y differentially affects basal transcription of CD5.¹⁶

A different study unveiled the importance of the E47 transcription factor in regulating CD5 expression, by using T cell lines harboring CD5 mutations in the κ E2 it was proven that E47 binds to this region and that its absence results in overactivation of the CD5 promoter. It was also shown that E47 expression is down modulated throughout thymic development, and this decrease directly correlates with an increment in CD5 expression. Finally, it was shown that *in vivo* injection of anti-CD3 in Rag-2 deficient mice results in induction of CD5 surface levels and reduction of E47 expression in DN3 thymocytes and that activation *in vitro* of DP cells by using anti-CD3 antibody results in activation of the CD5 promoter region.¹⁷

The molecular mechanisms involved in the regulation of CD5 expression are not yet fully characterized. However, it has been shown that TCR-signaling strength correlates with increased ETS expression¹⁸ and downregulation of E47 corepressor,¹⁷ which is in accordance with the differential CD5 expression on thymocyte subsets; i.e. CD4+ T cells expressing higher CD5 levels than

CD8+ T cells require higher TCR signals for their selection than CD8+ T cells.

4 | IN THE SEARCH OF THE CD5 LIGAND

One of the most important questions about CD5 that remains unanswered is the identity of its endogenous ligands. Several approaches have been used to address this; however, up to date there has not been a conclusive answer for this question. Initially, the CD72 receptor, expressed in B cells, was identified as probable ligand for CD5.¹⁹ Also, different studies showed the interaction of CD5 with different glycoproteins such as gp35-40, gp150, and gp200, which was suggestive of different CD5 ligands. Additionally, the IgVH framework region of immunoglobulins was also identified as a possible ligand.²⁰ More recently, a possible interaction of CD5 with itself has also been reported.²¹

CD5, as a scavenger receptor, can also bind glucans present in the wall of extracellular fungi and also to hepatitis C virus.^{22,23} However, since all these works have been performed *in vitro* and despite all the efforts, different independent studies are required to corroborate these findings or demonstrate additional interactions of CD5 *in vivo*.

5 | MOLECULAR BASIS UNDERLYING CD5 SIGNALING

Some of the previous studies imply in some degree a functional role of CD5; however, understanding the mechanisms through which CD5 mediates its effects is a work in progress and required an initial awareness of the regions within this receptor responsible for of these effects. Initial experiments, by two different groups, showed the presence of a functional domain near the C-terminal region of human CD5, comprising two serines (S459, S461). In these works, it was demonstrated that casein kinase 2 (CK2) is required for the phosphorylation, both constitutive and after activation of CD5; it was also proven that the CK2 β subunit binds to this region and is crucial for these effects.^{24,25} Besides the importance of the CK2-binding domain of CD5, it was also clearly established by different studies that this receptor contains at least three tyrosines, as well as two threonines, susceptible to phosphorylation within the cytoplasmic region. To assess this matter, different works have studied the role of tyrosines 429, 441, and 463 of the human variant of CD5. Some of these experiments showed that CD5 can be phosphorylated by Lck or Fyn kinases in the tyrosines 429 and 463, after OKT3 or pervanadate stimulation, and that Lck activity is required for *in vivo* phosphorylation of these sites.^{26,27} Concerning the role of the cytoplasmic threonines of CD5, one independent study showed the importance of these residues (T410 and T412) in regulating protein kinase C (PKC)-mediated diacyl glycerol (DAG) generation through activation of CD5.²⁸

Although some of the previously described experiments suggested that CD5 is not only a cell surface marker but also a functionally relevant molecule, in the following sections we will discuss some of the most relevant findings that demonstrated the functionality of this receptor in different immune processes.

6 | THE ROLE OF CD5 IN MODULATING TCR SIGNALING

6.1 | Initial view of CD5 as a positive modulator of TCR signaling

The first experiments assessing the role of CD5 in T cell biology were performed during the 1980s. One of these studies showed that the use of an anti-CD5 antibody (Tp67 10.2) together with an anti-CD3 antibody in human peripheral blood mononuclear cells enhances proliferation of T cells compared to the anti-CD3 alone, suggesting that CD5 positively regulated TCR signaling.²⁹ Another report showed that anti-CD5 together with plate-bound OKT3 antibody is sufficient to increase proliferation of resting human T cells, whereas plate-bound OKT3 antibody by itself is not enough to observe this effect. It was also shown that CD5 stimulation enhanced IL-2R expression and IL-2 secretion in resting human T cells, when acting together with plate-bound OKT3.³⁰ Altogether, these initial findings set the tone for future experiments, proposing CD5 as a positive regulator/costimulator of TCR signals.

6.2 | CD5 as TCR independent signaling receptor

Although the results showing the costimulatory properties of CD5 in TCR signaling, several experiments addressed the ability of CD5 to generate TCR independent signaling. For example, the use of a different antibody directed against CD5 (TS 43 Ab) in the presence of monocytes-induced T cell proliferation, IL-2R expression, IL-2 secretion, and Ca^{2+} mobilization³¹; nevertheless, the need for monocytes in these experiments suggested that other molecules or cellular interactions may be involved in the observed effects, therefore making unclear whether CD5 signaling alone (without TCR signaling) could induce T cell responses. Furthermore, it was shown that the use of the Cris-1 monoclonal antibody alone, directed toward CD5, induced some intracellular signal events different from those previously observed by stimulation of the TCR pathway with anti-TCR or anti-CD3 antibodies. Using soluble anti-CD5 (Cris-1) in the presence of monocytes was enough to induce proliferation of resting T lymphoblasts; however, the events observed by using this antibody alone did not trigger the inositol phosphate metabolism or Ca^{2+} mobilization, thus suggesting a different pathway than that observed in canonical TCR signaling. Additionally, the use of Cris-1 mAb induced PKC activity through the induction of DAG. Finally, it was also demonstrated that stimulation with Cris-1 mAb induces phosphorylation of different proteins, some of them related to the TCR-signaling pathway, thus showing a cross-talk between CD5 and TCR-signaling pathways. These results proved for the first time that CD5 by itself is enough to induce intracellular signaling events in T cells; however, it is apparent that some of these events are different from those observed in canonical TCR-signaling pathway.³²

Some studies showed that CD5 is able to induce TCR-dependent and independent production of DAG in Jurkat cells. Interestingly, both of the TCR-dependent and TCR-independent pathways seem to be different. The TCR-related pathway depends upon recruitment and activation of PC-PLC, whereas the TCR-independent pathway induces

de novo synthesis of DAG through a non-PC-PLC pathway.^{33,34} Furthermore, one of the most relevant findings in this study was showing a functional requirement of the distal region of CD5 for regulating the DAG production, thus suggesting that some residues near the C-terminal end (CK2-binding domain) are important for the biology of this receptor. However, further characterization of the regions within CD5 that have functional properties is a work in progress up to this date.

6.3 | Current view of CD5 as a negative regulator of TCR signaling

While some experiments showed the role of CD5 as a possible costimulator/positive regulator of TCR responses in peripheral T cells, the generation and characterization of CD5-deficient mice challenged this view. Tarakhovsky et al. in 1995 showed that thymocytes from the CD5-deficient mice are hyperresponsive to anti-CD3 stimulation. It was also shown that stimulation with anti-CD3 and PMA in both CD4+ and CD8+ developing T lymphocytes, but not in mature peripheral T cells, induces hyperproliferation of these cells. Additional experiments showed that anti-CD3 alone or together with anti-CD4 antibodies increases the Ca^{2+} mobilization and also induces hyperphosphorylation of proteins like PLC γ 1, TCR ζ chain, and Vav.³⁵ It was also reported that after CD5 stimulation there is an increase in phosphorylation of Fyn at its negative regulatory tyrosine, leading to the inhibition of ZAP-70.³⁶ Finally, experiments using different TCR-transgenic mice deficient for CD5 showed conclusively that CD5 can modulate thymic selection by "fine tuning" the TCR signal intensity.^{12,37,38} These experiments, together with a report showing a possible interaction of CD5 with SHP-1 by using CD5-CD6 chimeras,³⁹ strongly suggested a role for CD5 as a negative regulator of TCR signals. The role of SHP-1 mediating CD5 negative regulation remains controversial; although a recent report has shown that this molecule is associated with CD5 and that this association is increased after TCR stimulation and depends on the phosphorylation of CD5 tyrosines, the analysis of SHP-1 deficient mice demonstrated that there are no differences in CD5 expression, in the phosphatase activity coimmunoprecipitated with CD5 or in the calcium mobilization after TCR/CD5 cross-linking between SHP-1 deficient and sufficient cells. In this study, it was also shown that the deficiency of SHP-1 does not affect the inhibition of positive selection seen in H-Y TCR transgenic mice overexpressing CD5.⁴⁰ These suggest that CD5 is not a substrate of SHP-1 and is not involved in the negative regulation mediated by CD5. However, the association of SHP-1 to CD5 and the localization of CD5 in the immunological synapse may play a role in TCR-signaling regulation.

Additional studies, supporting the role of CD5 as a negative regulator of TCR signaling, have also been published. These works have shown the association of proteins related to the negative regulation of TCR-signaling pathway, like c-Cbl, RasGAP, or PI3K, to CD5 peptides comprising the 429–441 tyrosines or the 463 tyrosine.^{41,42} Sequence analysis of the 429–441 region showed that this region resembles ITAM domains present in other receptors; however, different functional studies suggest it acts more like an ITIM domain than an ITAM domain (this will be discussed later). Recently, it has been

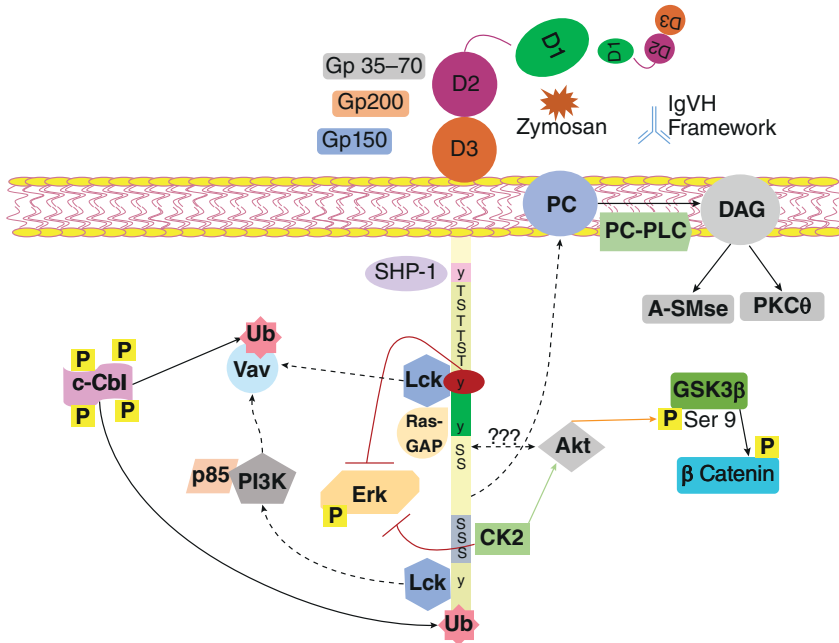


FIGURE 1 CD5 regulates different signaling pathways. To simplify, the postulated signaling pathways downstream of PC-PLC (phosphatidylinositol-dependent phospholipase) mediated activation of A-SMase (alpha sphingomyelinase) are not depicted. After activation through its extracellular domains, CD5 is able to modulate different signaling pathways. Through the binding of CK2, CD5 is able to activate AKT-mediated pathways and negatively regulate ERK phosphorylation. Additionally, Y429/441 residues are able to negatively regulate TCR signaling and survival through ERK inhibition. C-Cbl activation and degradation of Vav and CD5 itself has also been demonstrated to be regulated by the C-terminal region of this receptor. Finally, other signaling pathways have been proposed to be modulated through CD5, including phosphorylation of Vav and PI3K by Lck as well as RasGAP-mediated downmodulation of TCR signaling

demonstrated that CD5 is an important scaffold for Cbl and Cbl-b ubiquitinylation following TCR engagement.⁴³ In this context, Roa et al. have shown the importance of the carboxy-terminal region of human CD5 in c-Cbl-mediated degradation of Vav, thus reinforcing the role of this receptor as a negative regulator of TCR signaling.⁴⁴ Some of the extracellular ligands and intracellular signaling molecules that interact with CD5 are exemplified in Fig. 1.

Most of the experiments showing the role of CD5 as a positive modulator of TCR responses were performed on peripheral T cells or mature T cell lines (Jurkat cells), whereas the majority of the initial experiments showing a role of CD5 as a negative regulator were mainly performed on immature T cells; these led to the proposal of a differential role of CD5 in modulating immature and mature T cell responses. A limited number of experiments regarding this matter have been performed. One report showed that cross-linking with anti-CD5 antibody in thymocytes, but not in splenocytes, increased the tyrosine kinase activity of CD5-associated CK2, suggesting that CD5 might work in a different way in developing and mature T cells.⁴⁵ Recently, a work by Axtell et al. showed that mature T cells in CD5-deficient mice as well as CD5-CK2 mutant mice hyperproliferate in a secondary response to CD3 cross-linking or myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), these results clearly suggest that mature T cells responses are negatively regulated by CD5.⁴⁶ Despite these works, the question about a differential role of CD5 in thymocytes and mature T cells remains unanswered and the most accepted view of CD5 is that of a negative regulator of T cell receptor signaling.

7 | ROLE OF CD5 IN B CELL IMMUNOBIOLOGY

An important role of CD5 in the B cell biology was first suggested by the identification of CD5 on the surface of B cells in a B-CLL. Later, it was proven that CD5 is expressed not only on the surface of B-CLL

cells but also in a subpopulation of B cells found in the human fetal bone marrow, spleen, and lymph nodes. Additional characterization of mouse lymphocytes showed the presence of CD5 in a subpopulation of B cells, denominated as B1 cells and now referred as B1-a cells (B1 cells are now subdivided in CD5- B1b cells and CD5+ B1a cells).

As we previously mentioned, CD5 expression patterns are not the same in human and mouse lymphocytes⁴⁷; this raises a very important question: What drives the differences in CD5 expression of human versus mouse B cells? In this context, it has been demonstrated that an alternative Exon1 (E1B) for CD5 exists only in human B cells and that this E1B encodes a truncated CD5 protein that remains inside the cytoplasm. Activation of T cells induces the expression of the regular Exon 1 (E1A) only, whereas activation of B cells induces expression of both E1A and E1B. It has also been found that pre-B cells express mainly the E1B exon while B-CLL cells express mainly the E1A exon thus explaining why pre-B cells do not express CD5 whereas B-CLL cells do.⁴⁸

Regarding the function of CD5 in B cells, the relationship between CD5 and the BCR was first described by Lankester et al. in 1994. By using B-CLL cells, it was shown that CD5 associates with the BCR-Ig α complex and that ligation of the BCR complex induces tyrosine phosphorylation of CD5.⁴⁹ A different study performed in CD5-deficient B1 cells demonstrated the role of this receptor as a negative regulator of the BCR signaling; the use of anti-IgM antibodies to cross-link the BCR showed that the absence of CD5 enhances the proliferation of B cells. Further characterization of these CD5-deficient B1 cells also showed a decrease in apoptosis and a faster progression to the S phase of the cell cycle. Finally, it was also demonstrated that the presence of CD5 on the B1 cells inhibits NF κ B translocation to the nucleus.⁵⁰ Although these findings clearly showed the role of CD5 as a negative regulator of BCR signals in B1 cells (both B1-a and B1-b cells), the specific role of CD5 in B1-a cells could not be assessed as CD5 is the marker used to identify these cells.

To determine the region and mechanisms through which CD5 regulates the BCR signals, different experiments have been performed.

Usage of a B cell lymphoma expressing a chimera, containing the extracellular portion of the low affinity IgG receptor (Fc γ RIIB) and the intracellular portion of the human CD5, has further confirmed the role of CD5 as a negative regulator of BCR signaling. In these experiments, it was shown that coligation of the BCR and the CD5-IgG chimera induces a reduction in Ca²⁺ mobilization and ERK 2 activation; interestingly, the effects observed appear to be independent of SHP-1 recruitment and associated with CD5.⁵¹ Moreover, in this work it was also shown that a CD5-IgG receptor chimera lacking the region comprising tyrosines (429–441) is unable to negatively regulate the BCR-signaling pathway. Further studies showed that Y429, but not Y441, is required to inhibit the BCR responses.⁵² These results strongly support the idea that the 429–441 region within the cytoplasmic acts as a functional ITIM (negative regulator) domain in B cells. Concerning the potential mechanisms of this negative regulation of BCR signals, it is worth mentioning that there is opposing evidence suggesting that a SHP-1 mechanism, mediated by Lyn activity is, at least partially, important for the CD5-mediated effects observed on the BCR signaling,⁵³ although this remains controversial.

The role of CD5+ B cells in cancer has also been controversial. CD5+ B cells have been proposed to possess a propensity for malignant transformation due to the self-renewing property they possess. Interestingly, regulatory B cells have been shown to express CD5. Recently, it has been reported that a subpopulation of intratumoral CD5+ B cells that do not express IL-6R α is able to bind IL-6 through CD5 directly, leading to the activation of gp130 and Jak3 thus inducing the activation of STAT3 which, in a feed-forward loop, increases the expression of CD5. Using the B16 melanoma tumor model, this report also demonstrated that CD5+ but not CD5- B cells promoted tumor growth, indicating that CD5 might act as a modulator of tumor progression through direct binding to IL-6 triggering of signaling pathways such as the JAK-STAT pathway.⁵⁴ However, in contrast to IL-6R that can induce signaling via its soluble form, the soluble form of CD5 does not have this ability, although it can bind IL-6.⁵⁵

Finally, it has also been shown that a CD5 single nucleotide polymorphism (SNP) (CD5V471A) seems to correlate with a worse outcome in B-CLL patients.⁵⁶ Although little is known about the role of this SNP in CD5-mediated functions, recent data have shown that B-CLL patients that bare an ancestral haplotype with a proline instead of a leucine at position 224 (P224L) and an alanine instead of a valine at position 471 (A471V) present better prognosis and longer lifespan, and the same has been reported in melanoma patients.^{57,58} In this context, this SNP also appears to be biologically relevant in T cells, as suggested by a recent report showing that T lymphocytes carrying the ancestral 471 alanine have an enhanced proliferation and produce increased levels of IL-2 and IFN- γ when stimulated with anti-CD3 antibodies.⁵⁹

8 | THE ROLE OF CD5 IN LYMPHOCYTE SURVIVAL

The role of CD5 in lymphocyte apoptosis/survival has been studied both in B and T cells. However, it remains to be fully explored if the

activities of CD5 as a negative regulator of TCR and BCR signaling and as a modulator of cell survival are independent of each other or are somehow related. In this section, we will discuss some of the studies that have helped in the understanding of the role of this receptor as a cell survival modulator.

8.1 | Role of CD5 in thymocyte survival

The first experiments that suggested the role of CD5 in regulating T cell survival were performed in developing thymocytes. These experiments demonstrated that engagement of CD3 and CD5 using specific antibodies results in pERK induction; in this context, the role of pERK as an antiapoptotic molecule has long been known (reviewed in Ref. 60). Furthermore, these experiments also showed that cross-linking of CD3 and CD5 with monoclonal antibodies induces the expression of Bcl-2. Interestingly, this induction is ablated by the use of PD9805, a specific pERK inhibitor.⁶¹

By using CD5-deficient mice, it was demonstrated that thymi obtained from 12-week-old mice have reduced cellularity compared to those from WT mice, as a result of increased thymocyte apoptosis and an overactivation of Caspase 3. Interestingly, this increased cell death correlated with an impaired AKT phosphorylation of CD5-deficient thymocytes after CD3 and CD28 cross-linking, suggesting a major role of AKT in CD5-mediated protection from apoptosis of developing T cells.⁶²

How CD5 modulates thymocytes survival has not been fully elucidated. However, it was recently reported that CD5-CK2 signaling pathway is in part responsible for the effect of this molecule in thymocyte survival. Using a gene-targeted mouse in which the CD5-CK2 binding domain was selectively ablated, Mier et al. determined the functional role of this domain in T cell survival during thymic development.⁶³ This experiment showed that the inability of CD5 to bind CK2 during thymic development results in an increased generation of CD4+ T cells at the expense of a reduced number of DP cells. This shift in the thymic subpopulations is the result of at least two combined effects: First, the absence of the CD5-CK2 binding region results in an increased apoptosis of DP cells, although it also affects CD4+ T cells and CD8+ T cells; and second, the absence of this domain increased pERK levels which results in altered negative and positive selection processes.⁶³ Interestingly, increased pERK levels did not correlate with increased TCR proximal signaling, thus suggesting that the CD5-CK2 binding domain, in addition to regulating thymocyte survival, modulates TCR signaling by an alternative noncanonical pathway (Fig. 2).

To determine whether the tyrosine residues within CD5 play a role in modulating T cell survival and AKT activity, Mier et al. created different CD5 point mutants and transfected them in EL4 thymoma cells. Analysis of four different mutants showed that mutation of the Y429 residue results in an increased apoptosis of these cells without any stimuli or after activation with anti-CD3 antibodies. One very interesting feature of this mutation is that the observed apoptosis is correlated with an increased phosphorylation in ERK 1/2; however, it does not seem to be related to pAKT. Although EL4 clones with containing the 441 and the 463 mutations also displayed increased baseline

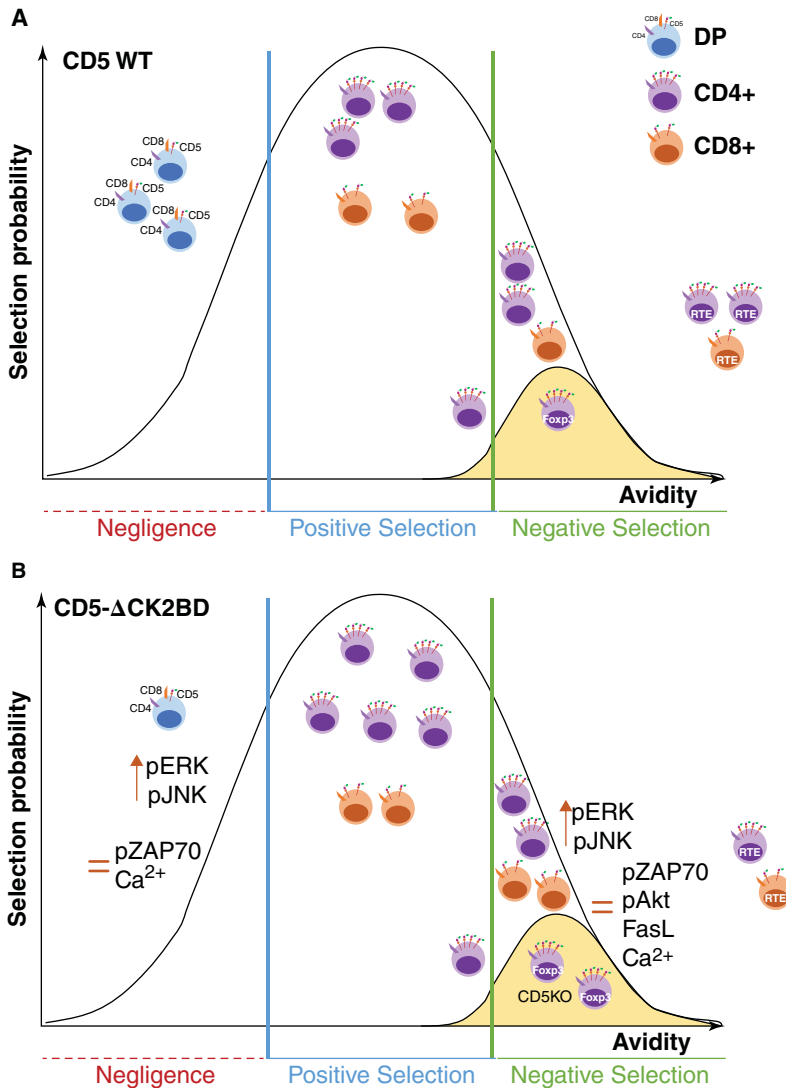


FIGURE 2 Role of CD5 during thymocyte selection and central tolerance. An adequate selection during thymocyte development is a crucial process to generate tolerance (central tolerance). The role of CD5-CK2 binding domain has been addressed using gene-targeted knock-in mice. (A) CD5 modulates thymocyte selection at the DP (with low to intermediate avidity) to CD4⁺/CD8⁺ single positive transition. High avidity of the TCR promotes negative selection as well as generation of Treg cells. (B) The absence of the CK2-binding region promotes an increased selection of CD4⁺ cells by affecting both selection signals and cell survival. The absence of this region also promotes a reduction in RTE (recent thymic emigrants) and a preferential death of CD8⁺ single positive thymocytes. The proteins affected by this region are pERK and pJNK, whereas TCR proximal signals like ZAP70 and Ca²⁺ mobilization remain unaffected. Treg selection is only affected in the complete absence of CD5, whereas the absence of the CD5-CK2 binding region does not affect this process, suggesting the involvement of other CD5 domains

apoptosis, none of these events seemed to be related to pERK or pAKT. Furthermore, the data obtained from these experiments clearly show a major role of the Y429 residue in modulating T cell survival, through an ERK-dependent pathway. Furthermore, Y429 domain appears to function as a pseudo-ITIM motif involved in TCR down modulation, similarly to previous findings in B cells.⁶⁴ However, the role of pAKT in CD5-mediated T cell survival remains controversial and more experiments need to be performed to conclusively address the participation of this molecule.

8.2 | Role of CD5 in mature T cell survival

Several studies have demonstrated the role of CD5 as a promoter of mature T cell survival. Using cytotoxic T cell clones, Friedlein et al. demonstrated that clones with low expression of CD5 are more susceptible to AICD than those with high expression of CD5. Moreover, they demonstrated that exogenous expression of CD5 in CD5-deficient JURKAT cells protects them from AICD after PMA activation. Interestingly, utilization of a blocking anti-CD5 antibody induces the expression of FasL in cytotoxic T cell clones, which correlates with increased apoptosis.⁶⁵ Furthermore, it was shown that

upregulation of CD5 in CD4⁺ autoreactive T cells protects them from Fas-mediated cell death.⁶⁶

Further experiments suggesting the role of CD5 as a prosurvival molecule were performed by using an EAE induction model. Interestingly, CD5-deficient mice immunized with MOG peptide showed a significant decrease in the clinical score of EAE compared to WT controls (Fig. 3B). These findings were unexpected since the main role of CD5 as a negative regulator predicted an enhanced disease due to hyperactivation of T cells. Interestingly, despite the increased activation of autoreactive T cells, the EAE score was reduced as a result of enhanced AICD of CD5-deficient T cells compared to CD5 sufficient cells. To further prove these findings, blocking of CD5 with a recombinant protein was performed showing similar results.⁶⁷ Altogether, these studies have definitely proven that CD5 is not only a negative regulator of TCR signaling but also a promoter of T cell survival. However, not many works have studied the domains through which CD5 mediates its effects and the molecular mechanisms involved.

Regarding this issue, we previously mentioned in this review that the carboxy terminal region of CD5 contains a CK2-binding region, comprising S458–S461 residues. CK2 is a serine/threonine kinase that has been shown to be a major regulator of apoptosis/survival

in different cell types (reviewed in Ref. 68). In this context, MOG immunization of CD5-deficient mice reconstituted with a mutant CD5 lacking the CD5-CK2 binding domain, showed that the CD5-CK2 binding domain is important for the regulation of AICD in T cells, since the absence of this domain results in a similar phenotype to that observed in CD5-deficient mice immunized with MOG. These data demonstrated an important role of this domain in regulating CD5-mediated T cell survival^{46,69}; however, if CD5-CK2 signaling pathway regulates mature T cell survival in the same fashion as it does in thymocytes, it remains to be studied.

Nonetheless, the CK2-binding domain of CD5 is not the only region that may modulate T cell survival. Some experiments have shown that CD5 peptides comprising the tyrosines 429 and 441, or the 463 tyrosine are able to bind to the PI3K p85-SH2 domain,⁴¹ although the Y463 peptide binds to this domain with threefold greater affinity. Binding of the PI3K protein to CD5 is of great importance because one of the most relevant signaling pathways related to cell survival and cell cycle is the PI3K-AKT pathway (reviewed in Ref. 70). Little has been studied about the PI3K pathway and its relationship with CD5 signaling. However, some experiments have shown that PI3K is activated in human T lymphocytes following the simultaneous engagement of CD28 and CD5 in the presence of PHA, although this activation does not lead to an increase in AKT activity, measured by phosphorylation of the H2B.⁷¹ A relationship between CK2 and AKT has been previously reported^{68,72}; this prompted to analyze the role of this CD5-CK2 binding domain in modulating AKT levels. Interestingly, a recent study analyzing the role of the CK2-binding domain of CD5 in Th17 generation has shown that the absence of the CK2-binding domain in peripheral T cells significantly reduces the phosphorylation of AKT in these cells after stimulation with anti-CD3 alone or together with anti-CD5 or in Th17-polarizing conditions. Further characterization of this effect showed a reduction in GSK3 β , although a direct correlation between the lack of pAKT and apoptosis needs to be demonstrated in these cells.^{69,73} However, analysis of developing thymocytes showed that pAKT (under basal conditions and after TCR stimulation) is not affected by the CD5-CK2 binding domain,⁶³ pointing out to other regions of CD5, previously mentioned, as the probable modulators of CD5-mediated AKT activity in T cells.

8.3 | Role of CD5 in B cell survival

Little is known about the role of CD5 in B cell survival. Most studies have been performed in “abnormal” B cells (B-CLL cells), which might not reflect its exact role in the biology of “normal” B cells. Up to this date, the underlying mechanisms through which CD5 controls lymphocyte survival are not yet fully understood.

In this context, it was demonstrated that CD5+ B cells produce higher amounts of IL-10 than CD5- B cells, and that the ectopic expression of CD5 in CD5- B cells induces the production of IL-10. In addition, blockage of IL-10 with a monoclonal antibody induces more apoptosis of a subset of IL-10 secreting B cells compared to control mice and CD5- B cells are more susceptible to apoptosis after BCR stimulation than CD5+ B cells.⁷⁴ These findings indirectly suggest a

role of CD5 in B cell survival through regulation of IL-10 levels in homeostatic conditions.

Further support on the role of CD5 as a prosurvival molecule in B cells was obtained from experiments performed in B-CLL cells, and CD5 transfected Daudi cells showing that CD5 is hyperphosphorylated on tyrosine residues in these cells under basal conditions, thus implying that constitutive activation of CD5 might enhance B cell survival in disease conditions.⁷⁵ The mechanisms involved in CD5-mediated B cell survival have yet to be fully understood; however, several reports have shed light onto the potential signaling pathways involved. It was demonstrated that anti-CD5 cross-linking induces PKC activation in a subset of B-CLL cells, which correlated with the induction of the Bcl-2 prosurvival family member, Mcl-1.⁷⁶ Further analysis of the mechanisms involving CD5 as a prosurvival molecule in B cells has shown that Lyn-mediated SHP-1 recruitment of CD5 in some B-CLL cells may be responsible for their increased resistance to apoptosis.⁷⁷ Interestingly, and opposite to T cells, in B cells evidence exists that suggests a role of CD5 as a proapoptotic molecule. Characterization of the B1 population in CD5-deficient mice has shown that the absence of CD5 in these cells protects them from apoptosis, although these data are difficult to interpret as the presence of CD5 defines the B1-a subpopulation (but not the B1-b population), and the differences between these two populations are yet to be clearly defined.⁵⁰ Additional studies supporting the role of CD5 as an apoptosis inducer propose that ligation of CD5 in resting B cells but not in T cells induces apoptosis.⁷⁸ In this context, it has been shown that anti-CD5 treatment in B-CLL can induce apoptosis in a subgroup of patients.⁷⁹⁻⁸¹

Altogether, these findings suggest that CD5 mainly acts as a prosurvival molecule in B and T cells, but under some experimental or disease conditions (such as B-CLL) it might work as a proapoptotic molecule.

9 | CD5 AS A REGULATOR OF T CELL ANERGY

The immune system has the ability to mount a functional response toward almost everything; this is mainly due to the broad repertoire of TCRs and BCRs. In order to avoid unwanted responses, the immune system has several mechanisms to avoid self/reactivity (immune tolerance), which include negative selection, anergy induction, activation-induced cell death, and the generation of regulatory T cell (Tregs).^{82,83} Importantly, CD5 has been shown to participate in all these processes. In this section, we will discuss some of the most relevant findings regarding the immunomodulatory role of CD5.

The impact of CD5 in the thymic development, and therefore in negative selection, has already been discussed above. Regarding T cell anergy (Fig. 3A), it has been reported that chronic exposure of CD8+ T cells to their cognate antigen makes them anergic and this state correlates with increased CD5 expression.⁸⁴ In this context, it has been shown that CD8+ responses against a B16 melanoma established tumor are higher in CD5-deficient compared to CD5 sufficient mice, mainly due to a more activated phenotype and enhanced cytokine secretion by CD8+ T cells infiltrating the tumor. These results argue

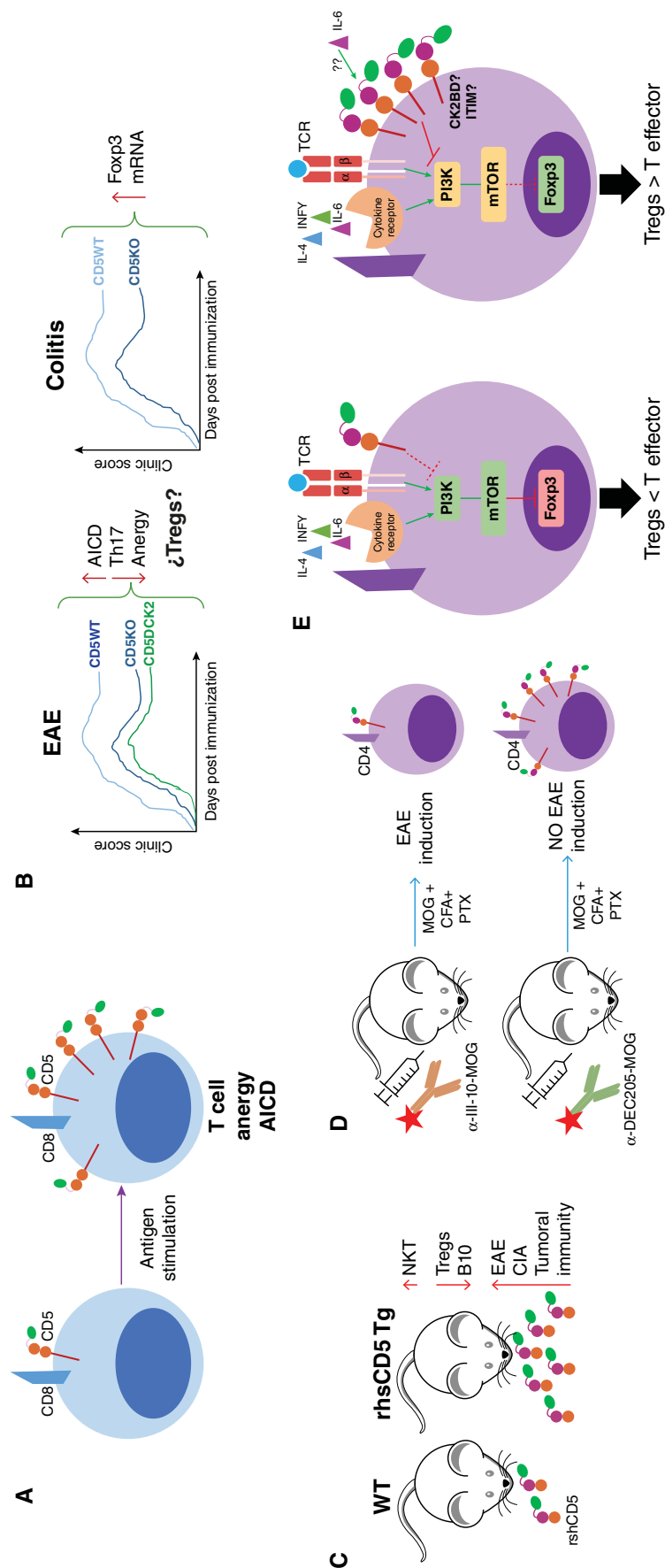


FIGURE 3 Role of CD5 during peripheral tolerance. CD5 has been implicated in several mechanisms of peripheral tolerance. (A) The expression of CD5 is increased when CD8 T cells are chronically exposed to their antigens rendering them anergic. (B) CD5 has been implicated in the outcome of various autoimmune models: in the absence of CD5, the disease has a delayed onset and less severity. This has been attributed in the case of EAE to an increased AICD and a reduction of T cell anergy and reduced Th17 cells. In the model of dextran-induced Colitis-induced colitis, an increased Foxp3 mRNA expression in the colonic Tregs was detected. (C) CD5 can be found as a membrane-bound glycoprotein or a soluble form; transgenic mice that overexpress this latter form induces an increase in NKT cells and a reduction of Tregs and B10 cells, which correlates with enhanced immune responses. (D) In a model of EAE, it has been reported that anti-DEC-205-MOG DC targeting is associated with no induction of EAE, due to an increased expression of CD5 in autoreactive T cells. It was later demonstrated that this increased CD5 expression favors the generation of Tregs by a mechanism that involves the inhibition of the PI3K/mTOR pathway activated by effector cytokines (IL-4, IL-6, IFN- γ), or alternatively could be the result of reduced TCR signaling mediated by CD5 overexpression

in favor of a role of CD5 as an inducer of T cell anergy; however, this increased antitumor response is transitory as CD5-deficient CD8+ T also showed increased AICD,⁸⁵ suggesting a shared role of CD5 in modulating anergy and cell survival. Additional studies have shown that antitumor activity of CD8+ T cells is inversely correlated with the expression of CD5 and that the expression of CD5 appears to correlate with the intensity of the interaction between pMHC and the TCR.⁸⁶ Interestingly, this study also demonstrated that tumor-infiltrating lymphocytes with low expression of pMHC decrease their expression of CD5 in order to lower their activation threshold. It has been reported that cytokine-primed CD8+ T cells present a rapid downmodulation of CD5 expression and that this leads to an increased proliferation, cytolytic activity, and IFN- γ production.¹⁸ These results suggest that CD8+ T cells can modulate their CD5 expression in order to increase antigen responsiveness and overcome tumor escape.

Further studies addressing the role of specific domains within the CD5 cytoplasmic tail have shown that CD4+T cells from mice lacking the CD5-CK2 binding domain are more resistant to anergy.⁶⁹ This was evidenced in an EAE model where immunization with increasing doses of MOG, a model that mimics high dose tolerance, decreased disease severity in WT mice but not in CD5 or CD5-CK2 binding domain deficient mice (Fig. 3B), indicating that these mice did not reach tolerance. This was recapitulated *in vitro*, when CD4+ T cells from WT mice stimulated with anti-CD3 or MOG presented a reduced response and fewer cells entering cell cycle than CD4+ T cells from CD5 or CD5-CK2-deficient mice.

On the other hand, several reports indicate that CD5 levels regulate T cell sensitivity to antigenic responses in the periphery. In this context, response to an epitope of *L. monocytogenes* differs between two different T cell clones bearing distinct transgenic TCRs; LL056 transgenic T cells show high levels of CD5 expression, increased IL-2 production, and a more robust secondary response, whereas LLO118 T cells, which have lower levels of CD5, present a more robust primary response.^{87,88} The enhanced T cell response of LL056 T cells correlated with an increased calcium mobilization at early times after stimulation compared to that observed in LLO118 cells. Moreover, CD5 appeared to play an important role in this Ca²⁺ mobilization, as the LL056 CD5-deficient T cells showed reduced Ca²⁺ responses compared to CD5 sufficient ones.⁸⁹

10 | CD5 AS INDUCER OF IMMUNE REGULATION

As we previously mentioned, Tregs are a central part of the immune tolerance. Tregs are a subpopulation of CD4+ T cells that constitutively express CD25 and the transcription factor Foxp3. These cells exert a suppressive activity by cell-cell contact, metabolic disruption, cell lysis, and by the release of anti-inflammatory cytokines like IL-10, TGF- β , and IL-35.^{90,91} Regulatory T cells can be generated in the thymus (tTregs) or in the periphery from naïve T cells (pTregs). The generation of Tregs requires several signaling pathways like the ones downstream the TCR, CD28, and the common gamma chain (γ_c chain). It has been described that the alterations in the function

or expression of several signaling molecules like ZAP70, linker of activated T cells (LAT), PLC γ 1, DAG, CD3 ζ , PI3K, AKT, and mammalian target of rapamycin (mTOR) can affect the generation of Tregs (reviewed in Ref. 92). As we have mentioned above, some of these proteins have a known interaction with CD5; moreover, its role as a negative regulator of TCR signaling prompts the question as how does CD5 affect the generation of Tregs. In this context, Ordoñez et al. demonstrated that the absence of CD5 results in an increase of percentage and number of tTregs, which show a decreased susceptibility to apoptosis, as measured by Annexin V/7-AAD and caspase 3 activation. In contrast, naïve thymocytes from CD5-deficient mice showed enhanced cell death, which correlated with reduced levels of pAKT after stimulation with anti-CD3 + anti-CD28.⁶² It has been reported that the PI3K/AKT/mTOR pathway inhibits Tregs generation, and therefore it is possible that the decreased Akt phosphorylation might favor tTreg generation in CD5-deficient mice.⁹³ Interestingly, CD5-deficient Treg cells showed increased suppressive activity over their CD5-sufficient counterparts,⁶² in accordance with a previous report by Dasu et al., which demonstrated that CD5-deficient mice are less susceptible and have a delayed onset of dextran-induced colitis (Fig. 3B), which correlated with the increased expression of Foxp3 mRNA observed in the Tregs present in the colon of CD5-deficient mice.⁹⁴

Additionally, it has been reported that a DC-targeting strategy toward DEC-205 coupled with MOG renders the treated mice resistant to the induction of EAE and results in an increased expression of CD5 in the antigen-specific T lymphocytes. CD5 overexpression made these T lymphocytes anergic to a second challenge with MOG, although they remained functional after anti-CD3 stimulation and thus this process was named "selective anergy."⁹⁵ A later work showed that the increased CD5 expression in "selectively anergic" T cells was followed by the conversion of these cells into Tregs. This report also showed that CD4+ CD25- T cells with high CD5 expression are more susceptible to become Tregs than CD4+ CD25- T cells with lower or null CD5 expression. Moreover, the high expression of CD5 rendered CD4+ CD25- T cells unable to respond to effector cytokines such as IL-4, IL-6, and IFN- γ , which induce the activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway, known to inhibit Treg generation (Figs. 3D and E).⁹⁶ Treg induction in the periphery requires suboptimal TCR stimulation, which is provided in noninflammatory conditions or after chronic exposure to low amounts of antigen.⁹² Interestingly, it has been reported that CD8+ CD5^{hi} cells are more reactive to a TCR stimulus⁹⁷; if this was true also for CD4+ T cells, one would expect a reduced Treg generation in CD4+ CD5^{hi} cells, but instead there is an increase Treg generation, suggesting that CD4+ CD5^{hi} T cells are less reactive to TCR stimulus. These discrepancies could be due to the differences in the biology of CD8 versus CD4 T cells or to intrinsic characteristics acquired by each cell subpopulation during thymic development.

Beside Tregs, there are other regulatory subpopulations including Bregs and NKTs. It has been reported that a soluble form of CD5, which comprises the three ectodomains, exists and is generated after TCR activation by proteolytic excision of membrane-bound CD5.⁹⁸ This soluble form can alter the percentage of some immunoregulatory populations like B10/Breg cells. This was shown in a transgenic mouse that overproduces the soluble form of human CD5, in which the

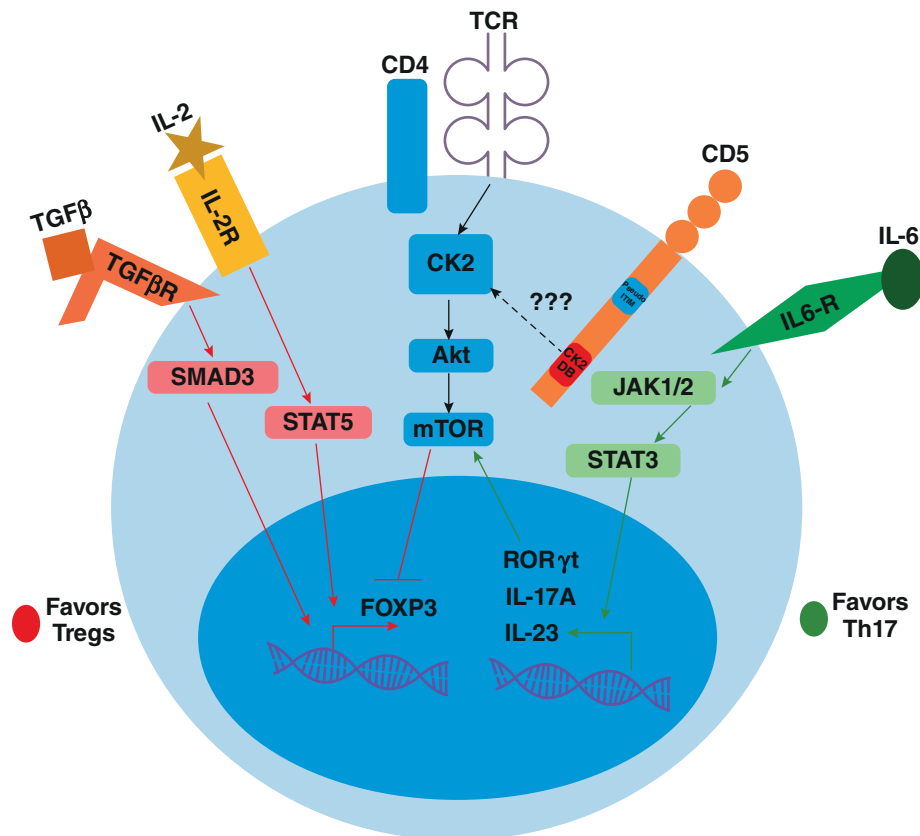


FIGURE 4 CK2 regulates CD4 T cell differentiation. After TCR activation, CK2 activity is upregulated which promotes the activation of the Akt/mTOR pathway. This pathway has been described to enhance Th17 and inhibit Treg differentiation. Additionally, CK2 enhances STAT3 activation in response to IL-6, possibly by an interaction with JAK, favoring Th17 differentiation. Pharmacological or genetic inhibition of CK2 does not enhance STAT3 activation, allowing the activation of STAT5 and Smad3 which favors Treg and inhibits Th17 generation. The mechanism by which association of CK2 to CD5 contributes to this effect is currently unknown

population of B10 cells was reduced in the spleen and peritoneal cavity, Tregs were reduced in LN, whereas the NKT population was increased in the spleen. All these effects are in agreement with the more aggressive EAE and collagen-induced arthritis autoimmune disease observed in these mice, and also correlated with a better antitumoral immunity (Fig. 3C).^{99,100} In this context, as mentioned above, CD5 is important for the expression of IL-10 by B cells, and CD5 positive B cells are one of the major producers of IL-10 (Bregs). Therefore, one could suggest that in these transgenic mice, soluble CD5 might be blocking Bregs homeostasis.

11 | CD5 AS REGULATOR OF Th DIFFERENTIATION

CK2 has been reported to be important for the regulation of Th17/Treg differentiation. In this context, pharmacological inhibition, or genetic silencing of CK2 in CD4 T cells leads to increased Treg generation and decreased Th17 differentiation, possibly as a result of lower STAT3 phosphorylation and the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathways (Fig. 4).^{101–103} As CK2 is constitutively associated with CD5, the role of CD5 in T cell differentiation has been recently addressed. A report by Sestero et al. demonstrated that CD5 can regulate the differen-

tiation of naïve T lymphocytes into different effector T cell subsets. Functional CD5-dependent CK2 signaling has been reported to be necessary for efficient differentiation of naïve CD4 T cells into the Th2 and Th17 lineage, but not to Th1. In a model of EAE, a reduction in the Th17 and IFN- γ +IL17+ subpopulations was found in CD5-CK2 deficient mice but not in WT or CD5-deficient mice, suggesting that the CD5-dependent CK2 pathway has a preferential role in the generation of IL-17 expressing cells or in the production of IL-17 per se.⁶⁹ Previous reports have shown that AKT enhances nuclear translocation of ROR γ t through the activation of mTORC1 and S6K2, and it also phosphorylates and inactivates GSK3 β , reducing the IFN γ R-induced STAT activation and NF κ B activation.^{104,105} In this context, as we previously mentioned, CD5 was shown to modulate AKT activity in thymic T cells; however, the modulation of AKT in peripheral T cells by the CK2-binding domain of CD5 was not proven until recently. This activation of AKT was shown to inhibit GSK3 β , reduce STAT1 phosphorylation and T-bet levels, leading to a decrease in sensitivity to IFN- γ -mediated responses. This promoted an efficient nuclear translocation of ROR γ t, suggesting a mechanism by which CD5 may promote the differentiation of peripheral T cells toward a Th17 phenotype.⁷³ In concordance with these studies, it has been reported that costimulation of CD5 in human naïve CD4+ T cells increases Th17 differentiation and that these cells are better producers of IL-17 compared to those generated

by CD28 costimulation. This effect is due to a more prolonged activation of STAT3 and an increase in ROR γ t expression. Also, this effect appears to be dependent on the elevation of the IL-23R levels induced by CD5 costimulation and it can be overcome by a strong CD28 costimulation, suggesting that other cells than mature APCs are responsible for the generation of Th17 cells, or that APCs might express CD5 ligands that can induce Th17 differentiation.¹⁰⁶ Interestingly, these IL-23R induction does not seem to be dependent of the CD5-CK2 mediated signaling⁶⁹ suggesting alternative pathways through which CD5 can regulate IL-17/Th17 generation. Regarding the role of the CK2-binding domain of CD5 in Treg generation, it was reported that the absence of this domain did not affect tTreg generation⁶³; however, unpublished data from our group (Burgueño-Bucio et al., in preparation) suggest that this domain does have an impact in iTreg generation.

12 | ROLE OF CD5 IN DENDRITIC CELL BIOLOGY

Lastly, there are very few studies regarding CD5 expression in other immune cell populations, besides T and B cells lymphocytes. Recently, it has been reported that human cDC2 in tonsils, LN, and blood can be subdivided based on their CD5 expression. Interestingly, those DCs with high CD5 expression showed increased migration toward CCL21, due to an augmented CCR7 expression, and induced higher T cell proliferation and IL-10, IL-17, IL-22, and IL-4 production.⁹ Another study has demonstrated that skin Langerhans and dermal DCs can also be subdivided based on CD5 expression: CD5+ skin DCs are more potent at inducing CD8+ and CD4+ T cell proliferation and increased production of granzyme B, IFN- γ , and TNF- α in CD8+ T cells and IL-22 in CD4+ T cells.¹⁰ Finally, it has also been proven that pDCs in blood can be further subdivided in CD5 positive and negative subpopulations and that CD5+ pDCs present a more mature phenotype, but that they do not produce great amounts of type I IFNs; nevertheless, they induce greater proliferation of B cells and induce plasma cell and Treg differentiation.¹¹ However, the functional relevance of CD5 in these different subpopulations of DCs needs to be further investigated. In this context, it has been observed that the majority of DC subpopulations in mice express CD5, although to a lesser extent than T cells and that the absence of CD5 has no effect on the generation of DCs, but it does affect their function, as CD5-deficient DCs appear to be more immunogenic (Burgueño-Bucio et al., unpublished data).

13 | CONCLUDING REMARKS

This review has shown that CD5 has a wide variety of functional activities in the immune system, although we still do not fully understand the complexity of this receptor. As CD5 modulates TCR and BCR signaling, Treg generation, anergy induction, and activation induced cell death, it can be considered an immune checkpoint inhibitor that, similarly to other negative costimulators such as PD-1, could be used to

potentiate antitumoral T cell responses or promote immunity against infections and modulate autoimmune reactions.

Increased CD5 expression has been shown in anergized T cells after DC antigen targeting, whereas CD5 downregulation allows cytotoxic T cells to overcome tumor evasion and promotes cell death of autoreactive T cells and B-CLL cells. However, the use of CD5 as a target for immunotherapy still requires further understanding of the molecular mechanisms by which CD5 expression is regulated.

With the use of new technologies, that is generation of knock-in mice, it is now possible to dissect individual components within the CD5 cytoplasmic region, including the CK2-binding region and the ITIM domain, to further understand how CD5 modulates TCR signaling, lymphocyte survival, and immune tolerance. With this review, we aimed to boost the research into the molecular mechanisms underlying the immunomodulatory properties of CD5.

AUTHORSHIP

E.B.-B. and C.A.M.-A. contributed equally in the writing and reviewing of this article. G.S. reviewed and edited the article.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in GS lab was supported by CONACyT Grants #166024 and #253274. EBB and CMA were recipients of predoctoral fellowships from Conacyt.

DISCLOSURES

All the authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. *J Immunol.* 1979;123:1312-1317.
2. Boumsell L, Coppin H, Pham D, et al. An antigen shared by a human T cell subset and B cell chronic lymphocytic leukemic cells. Distribution on normal and malignant lymphoid cells. *J Exp Med.* 1980;152:229-234.
3. Soldevila G, Raman C, Lozano F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:310-318.
4. Ledbetter JA, Rouse RV, Micklem HS, Herzenberg LA. T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med.* 1980;152:280-295.
5. Bofill M, Janossy G, Janossa M, et al. Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J Immunol.* 1985;134:1531-1538.
6. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:253-300.
7. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197:179-191.
8. Raman C, Knight KL. CD5+ B cells predominate in peripheral tissues of rabbit. *J Immunol.* 1992;149:3858-3864.

9. Yin X, Yu H, Jin X, et al. Human blood CD1c+ dendritic cells encompass CD5^{high} and CD5^{low} subsets that differ significantly in phenotype, gene expression, and functions. *J Immunol.* 2017;198:1553–1564.
10. Korenfeld D, Gorvel L, Munk A, et al. A type of human skin dendritic cell marked by CD5 is associated with the development of inflammatory skin disease. *JCI Insight.* 2017;2(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96101>.
11. Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:1988–1993.
12. Azzam HS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med.* 1998;188:2301–2311.
13. Jones NH, Clabby ML, Dialynas DP, Huang HJ, Herzenberg LA, Strominger JL. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature.* 1986;323:346–349.
14. Huang HJ, Jones NH, Strominger JL, Herzenberg LA. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:204–208.
15. Koskinen R, Göbel TW, Tregaskes CA, Young JR, Vainio O. The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol.* 1998;160:4943–4950.
16. Tung JW, Kunnavatana SS, Herzenberg LA, Herzenberg LA. The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC Mol Biol.* 2001;2:5.
17. Yang Y, Contag CH, Felsher D, et al. The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:3898–3902.
18. Gagnon J, Chen XL, Forand-Boulerice M, et al. Increased antigen responsiveness of naive CD8 T cells exposed to IL-7 and IL-21 is associated with decreased CD5 expression. *Immunol Cell Biol.* 2010;88:451–460.
19. Van de Velde H, von Hoegen I, Luo W, Parnes JR, Thielemans K. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature.* 1991;351:662–665.
20. Pospisil R, Fitts MG, Mage RG. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med.* 1996;184:1279–1284.
21. Brown MH, Lacey E. A ligand for CD5 is CD5. *J Immunol.* 2010;185:6068–6074.
22. Vera J, Fenutría R, Cañadas O, et al. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:1506–1511.
23. Sarhan MA, Pham TN, Chen AY, Michalak TI. Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *J Virol.* 2012;86:3723–3735.
24. Calvo J, Vildà JM, Places L, et al. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol.* 1998;161:6022–6029.
25. Raman C, Kuo A, Deshane J, Litchfield DW, Kimberly RP. Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J Biol Chem.* 1998;273:19183–19189.
26. Dennehy KM, Ferris WF, Veenstra H, Zuckerman LA, Killeen N, Beyers AD. Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5. *Int Immunol.* 2001;13:149–156.
27. Vila JM, Gimferrer I, Padilla O, et al. Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol.* 2001;31:1191–1198.
28. Vila JM, Ivo J, Places L, et al. Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling. *J Immunol.* 2001;166:396–402.
29. Ledbetter JA, Martin PJ, Spooner CE, et al. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J Immunol.* 1985;135:2331–2336.
30. Ceuppens JL, Baroja ML. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol.* 1986;137:1816–1821.
31. Spertini F, Stohl W, Ramesh N, Moody C, Geha RS. Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J Immunol.* 1991;146:47–52.
32. Alberola-Ila J, Places L, Cantrell DA, Vives J, Lozano F. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J Immunol.* 1992;148:1287–1293.
33. Simarro M, Pelassy C, Calvo J, et al. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol.* 1997;159:4307–4315.
34. Simarro M, Calvo J, Vilà JM, et al. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol.* 1999;162:5149–5155.
35. Tarakhovskiy A, Muller W, Rajewsky K. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1994;24:1678–1684.
36. Bamberger M, Santos AM, Gonçalves CM, et al. A new pathway of CD5 glycoprotein-mediated T cell inhibition dependent on inhibitory phosphorylation of Fyn kinase. *J Biol Chem.* 2011;286:30324–30336.
37. Tarakhovskiy A, Kanner SB, Hombach J, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science.* 1995;269:535–537.
38. Azzam HS, DeJarnette JB, Huang K, et al. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol.* 2001;166:5464–5472.
39. Perez-Villar JJ, Whitney GS, Bowen MA, Hewgill DH, Aruffo AA, Kanner SB. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2903–2912.
40. Dong B, Somani AK, Love PE, Zheng X, Chen X, Zhang J. CD5-mediated inhibition of TCR signaling proceeds normally in the absence of SHP-1. *Int J Mol Med.* 2016;38:45–56.
41. Dennehy KM, Broszeit R, Garnett D, Durrheim GA, Spruyt LL, Beyers AD. Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur J Immunol.* 1997;27:679–686.
42. Dennehy KM, Broszeit R, Ferris WF, Beyers AD. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur J Immunol.* 1998;28:1617–1625.
43. Voisinne G, García-Blesa A, Chaoui K, et al. Co-recruitment analysis of the CBL and CBLB signalosomes in primary T cells identifies CD5 as a key regulator of TCR-induced ubiquitylation. *Mol Syst Biol.* 2016;12:876.
44. Roa NS, Ordoñez-Rueda D, Chávez-Rios JR, et al. The carboxy-terminal region of CD5 is required for c-CBL mediated TCR

- signaling downmodulation in thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432:52–59.
45. Raman C, Kimberly RP. Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. *J Immunol.* 1998;161:5817–5820.
 46. Axtell RC, Xu L, Barnum SR, Raman C. CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J Immunol.* 2006;177:8542–8549.
 47. Berland R, Fiering S, Wortis HH. A conserved enhancer element differentially regulates developmental expression of CD5 in B and T cells. *J Immunol.* 2010;185:7537–7543.
 48. Renaudineau Y, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P. An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes. *Blood.* 2005;106:2781–2789.
 49. Lankester AC, van Schijndel GM, Cordell JL, van Noesel CJ, van Lier RA. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol.* 1994;24:812–816.
 50. Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science.* 1996;274:1906–1909.
 51. Gary-Gouy H, Bruhns P, Schmitt C, Dalloul A, Daëron M, Bismuth G. The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:548–556.
 52. Gary-Gouy H, Harriague J, Dalloul A, Donnadiou E, Bismuth G. CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol.* 2002;168:232–239.
 53. Ochi H, Watanabe T. Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity. *Int Immunol.* 2000;12:1417–1423.
 54. Zhang C, Xin H, Zhang W et al. CD5 binds to Interleukin-6 and induces a feed-forward loop with the transcription factor STAT3 in B cells to promote cancer. *Immunity.* 2016;44:913–923.
 55. Aparicio-Siegmund S, Deseke M, Lickert A, Garbers C. Trans-signaling of interleukin-6 (IL-6) is mediated by the soluble IL-6 receptor, but not by soluble CD5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484:808–812.
 56. Sellick GS, Wade R, Richards S, Oscier DG, Catovsky D, Houlston RS. Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis. *Blood.* 2008;111:1625–1633.
 57. Delgado J, Bielig T, Bonet L, et al. Impact of the functional CD5 polymorphism A471V on the response of chronic lymphocytic leukaemia to conventional chemotherapy regimens. *Br J Haematol.* 2017;177:147–150.
 58. Potrony M, Carreras E, Aranda F, et al. Inherited functional variants of the lymphocyte receptor CD5 influence melanoma survival. *Int J Cancer.* 2016;139:1297–1302.
 59. Cenit MC, Martínez-Florensa M, Consuegra M, et al. Analysis of ancestral and functionally relevant CD5 variants in systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One.* 2014;9:e113090.
 60. Strasser A, Puthalakath H, O'Reilly LA, Bouillet P. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol.* 2008;86:57–66.
 61. Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, Toyo-Oka K, et al. CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage. *J Immunol.* 2000;164:1260–1268.
 62. Ordóñez-Rueda D, Lozano F, Sarukhan A, Raman C, García-Zepeda EA, Soldevila G. Increased numbers of thymic and peripheral CD4+CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol.* 2009;39:2233–2247.
 63. Mier-Aguilar CA, Cashman KS, Raman C, Soldevila G. CD5-CK2 signaling modulates Erk activation and thymocyte survival. *PLoS One.* 2016;11:e0168155.
 64. Mier-Aguilar CA, Vega-Baray B, Burgueño-Bucio E, et al. Functional requirement of tyrosine residue 429 within CD5 cytoplasmic domain for regulation of T cell activation and survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;466:381–387.
 65. Friedlein G, El Hage F, Vergnon I, et al. Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death. *J Immunol.* 2007;178:6821–6827.
 66. Ryan KR, McCue D, Anderton SM. Fas-mediated death and sensory adaptation limit the pathogenic potential of autoreactive T cells after strong antigenic stimulation. *J Leukoc Biol.* 2005;78:43–50.
 67. Axtell RC, Webb MS, Barnum SR, Raman C. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J Immunol.* 2004;173:2928–2932.
 68. Ahmad KA, Wang G, Unger G, Slaton J, Ahmed K. Protein kinase CK2—a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul.* 2008;48:179–187.
 69. Sestero CM, McGuire DJ, De Sarno P, et al. CD5-dependent CK2 activation pathway regulates threshold for T cell anergy. *J Immunol.* 2012;189:2918–2930.
 70. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129:1261–1274.
 71. Gringhuis SI, de Leij LF, Coffey PJ, Vellenga E. Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1998;18:1725–1735.
 72. Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, et al. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* 2005;12:668–677.
 73. McGuire DJ, Rowse AL, Li H, et al. CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORγt localization. *Eur J Immunol.* 2014;44:1137–1142.
 74. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood.* 2002;100:4537–4543.
 75. Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, et al. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J Immunol.* 2007;179:4335–4344.
 76. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, et al. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk Res.* 2007;31:183–193.
 77. Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, et al. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2011;25:1768–1781.
 78. Pers JO, Jamin C, Le Corre R, Lydyard PM, Youinou P. Ligation of CD5 on resting B cells, but not on resting T cells, results in apoptosis. *Eur J Immunol.* 1998;28:4170–4176.

79. Cioca DP, Kitano K. Apoptosis induction by hypercross-linking of the surface antigen CD5 with anti-CD5 monoclonal antibodies in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:335–343.
80. Pers JO, Berthou C, Porakishvili N, et al. CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:44–52.
81. Klitgaard JL, Koefoed K, Geisler C, et al. Combination of two anti-CD5 monoclonal antibodies synergistically induces complement-dependent cytotoxicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2013;163:182–193.
82. Schwartz RH. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a006908.
83. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2009;11:21.
84. Stamou P, de Jersey J, Carmignac D, Mamalaki C, Kioussis D, Stockinger B. Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells. *J Immunol*. 2003;171:1278–1284.
85. Tabbekh M, Franciszkiewicz K, Haouas H, et al. Rescue of tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death enhances the antitumor CTL response in CD5-deficient mice. *J Immunol*. 2011;187:102–109.
86. Dorothee G, Vergnon I, El Hage F, et al. In situ sensory adaptation of tumor-infiltrating T lymphocytes to peptide-MHC levels elicits strong antitumor reactivity. *J Immunol*. 2005;174:6888–6897.
87. Weber KS, Li QJ, Persaud SP, Campbell JD, Davis MM, Allen PM. Distinct CD4+ helper T cells involved in primary and secondary responses to infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9511–9516.
88. Persaud SP, Parker CR, Lo W-L, Weber KS, Allen PM. Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat Immunol*. 2014;15:266–274.
89. Freitas CMT, Hamblin GJ, Raymond CM, Weber KS. Naive helper T cells with high CD5 expression have increased calcium signaling. *PLoS One*. 2017;12:e0178799.
90. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–564.
91. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:523–532.
92. Li, MO, Rudensky AY. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:220–233.
93. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7797–7802.
94. Dasu T, Qualls JE, Tuna H, Raman C, Cohen DA, Bondada S. CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells. *Immunol Lett*. 2008;119:103–113.
95. Hawiger D, Masilamani RF, Bettelli E, Kuchroo VK, Nussenzweig MC. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2004;20:695–705.
96. Henderson JG, Opejin A, Jones A, Gross C, Hawiger D. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity*. 2015;42:471–483.
97. Fulton RB, Hamilton SE, Xing Y, et al. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat Immunol*. 2015;16:107–117.
98. Calvo J, Places L, Espinosa G, et al. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens*. 1999;54:128–137.
99. Fenutria R, Martinez VG, Simões I, et al. Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PLoS One*. 2014;9:e84895.
100. Simoes IT, Aranda F, Carreras E, et al. Immunomodulatory effects of soluble CD5 on experimental tumor models. *Oncotarget*. 2017;8:108156–108169.
101. Ulges A, Witsch EJ, Pramanik G, et al. Protein kinase CK2 governs the molecular decision between encephalitogenic TH17 cell and Treg cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:10145–10150.
102. Gibson SA, Yang W, Yan Z, et al. Protein kinase CK2 controls the fate between Th17 cell and regulatory T cell differentiation. *J Immunol*. 2017;198:4244–4254.
103. Jang SW, Hwang SS, Kim HS, et al. Casein kinase 2 is a critical determinant of the balance of Th17 and Treg cell differentiation. *Exp Mol Med*. 2017;49:e375.
104. Beurel E, Jope RS. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 2008;283:21934–21944.
105. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, et al. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma. *Cell Rep*. 2012;1:360–373.
106. de Wit J, Souwer Y, van Beelen AJ, et al. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood*. 2011;118:6107–6114.

How to cite this article: Burgueño-Bucio E, Mier-Aguilar CA, Soldevila G. The multiple faces of CD5. *J Leukoc Biol*. 2019;1–14. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R>