

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“PAPEL DE CD40 EN LA FUNCION
PRESENTADORA DE ANTIGENOS
DEL LINFOCITO B”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

DANIEL ENRIQUE RODRIGUEZ PINTO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ

MEXICO, D. F. ,2005

M347294



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).

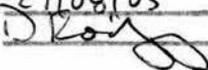
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

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

NOMBRE: Daniel Rodríguez Pinto

FECHA: 29/08/05

FIRMA: 

A Pao, mi dulce amor

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Moreno por darme su guía y su confianza para sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Enrique Ortega por su gran amistad que se tradujo en un apoyo extraordinario, constante y en todos los ámbitos de la vida.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Erika, Paty, Lupita, Gibrán y Juliana por compartir el trabajo siendo amigos y brindarme su ayuda incondicional. A Evita y Chayito por su apoyo.

A Daniel Sánchez, Carlos Salazar, Ricardo Vargas y Omar López por su excelente trabajo en el cuidado de los ratones en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM.

A todos los investigadores que donaron materiales para este trabajo, en especial a Leopoldo Santos, Claudia Sandoval y Héctor Romero por su colaboración en la donación de ratones Rag2^{-/-}.

A mis amigos Erika, Octavio, Ana y Rodrigo por acompañarme durante mis años en México.

A mis padres, abuelos, hermanos y sobrino por su inmenso amor que me ha hecho lo que soy y me acompaña siempre.

A mi esposa por compartir mis sueños y con su amor, su amistad y su compañía darme la fuerza para hacerlos realidad.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Instituto Mexicano del Seguro Social, ubicada en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Fue financiado por los proyectos No. 42393 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e IMSS-2004/074 del Fondo para el Fomento de la Investigación, junto con el apoyo de la beca de Doctorado otorgada por la Dirección General de Estudios de Postgrado de la UNAM.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	2
1. Introducción: El linfocito B como célula presentadora de antígenos	3
1.1. Localización	5
1.2. Endocitosis del antígeno	6
1.3. Procesamiento del antígeno	7
1.4. Proceso de activación	8
1.5. Participación en las enfermedades autoinmunes	12
1.6. Participación en vacunas	13
2. Justificación	14
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	16
5. Estrategia Experimental	17
6. Materiales y Métodos	19
6.1. Ratones	19
6.2. Purificación de linfocitos	22
6.3. Tinción con CFSE	25
6.4. Ensayos de transferencia de linfocitos	25
6.5. Citometría de flujo	25
6.6. Ensayos de producción de citocinas	26

7. Resultados	27
7.1. Proliferación de linfocitos T CD4 ⁺	27
7.2. Activación de linfocitos T CD4 ⁺	29
7.3. Activación de linfocitos B	32
7.4. Requerimiento de linfocitos B específicos para el antígeno	32
7.5. Proliferación homeostática de los linfocitos T CD4 ⁺	36
7.6. Proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ en ratones no linfopénicos	38
7.7. Papel de la interacción CD154-CD40	40
8. Conclusiones y Discusión	44
Referencias	52
Apéndice I: Abreviaturas	58
Apéndice II: Artículo publicado	59

RESUMEN

La importancia de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno (CPA) está bien establecida. Sin embargo, la activación de su función presentadora de antígenos depende de la unión de CD154, molécula expresada por los linfocitos T CD4 activados, al receptor CD40. Esto implica que otros tipos de CPA deben iniciar la activación de los linfocitos T CD4 antes de que los linfocitos B puedan contribuir. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de los linfocitos B para activar a linfocitos T CD4 vírgenes en ausencia de otros tipos de CPA con un modelo de transferencia adoptiva de linfocitos B y T CD4 antígeno-específicos a ratones deficientes de linfocitos de distinto haplotipo. Este sistema permitió demostrar que los linfocitos B antígeno-específicos son CPA competentes para linfocitos T CD4 específicos para el mismo antígeno. La presentación del antígeno in vivo resultó en activación tanto de los linfocitos T CD4 como de los linfocitos B. La función presentadora de antígenos de los linfocitos B transferidos depende de la interacción CD154-CD40, ya que la transferencia de linfocitos T CD4 deficientes de CD154 ó de linfocitos B deficientes de CD40 no indujo activación de los linfocitos T CD4 ni de los linfocitos B en respuesta a la inmunización. Estos resultados indican que los linfocitos B tienen la capacidad de completar su proceso de activación e iniciar respuestas inmunes primarias en ausencia de otros tipos de CPA.

SUMMARY

The importance of B cells as antigen presenting cells (APC) is well established. However, the activation of their antigen presenting function depends on the ligation of CD40 by CD154, a molecule expressed on activated CD4⁺ T cells. This implies that CD4⁺ T cell activation has to be initiated by other types of APC before B cells can contribute. The current studies were undertaken to determine if B cells can prime naive CD4⁺ T cells in the absence of other types of APC in a model of adoptive transfer of antigen-specific B cells and CD4⁺ T cells into histoincompatible lymphocyte-deficient mice. In this scenario, the transferred B cells are the only APC capable of generating the peptide-MHCII complex necessary for activation of the transferred CD4⁺ T cells. By means of this system we were able to demonstrate that antigen-specific B cells are competent APC for naive CD4⁺ T cells specific for the same antigen. *In vivo* antigen presentation resulted in expansion of both CD4⁺ T cells and B cells. The antigen presenting function of the transferred B cells was dependent on the CD154-CD40 interaction, as transfer of CD154-deficient CD4⁺ T cells or CD40-deficient B cells failed to induce T and B cell expansion in response to immunization. These results indicate that B cells have the capacity to complete their activation and initiate primary immune responses in the absence of other competent APC.

1. INTRODUCCIÓN: EL LINFOCITO B COMO CÉLULA PRESENTADORA DE ANTÍGENOS

Cuando un antígeno extraño entra al organismo, el sistema inmune adaptativo monta una respuesta capaz de eliminarlo de manera rápida y eficiente. Los linfocitos T CD4⁺ son las células encargadas de dirigir esta respuesta al poner en marcha diversos mecanismos efectores. Estas células se activan al reconocer, por medio de su receptor de células T (TCR), péptidos derivados del antígeno unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII) presentados sobre la superficie de otra célula, la cual se denomina célula presentadora de antígenos (CPA). Estas células, que incluyen a las células dendríticas (CD), a los linfocitos B y a los macrófagos son, por lo tanto, las encargadas de iniciar la respuesta inmune adaptativa [1].

Para activar a un linfocito T CD4⁺, las CPA deben ser capaces de : 1) endocitar el antígeno y procesarlo hacia péptidos, los cuales forman complejos con las MHCII, después de lo cual se expresan en la superficie celular; y 2) expresar las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 que, al unirse a su receptor CD28, expresado constitutivamente por el linfocito T CD4⁺, generan una segunda señal de activación que sinergiza con la del TCR [2] (Fig. 1). Para adquirir estas características, las CPA también deben sufrir un proceso de activación que se pone en marcha cuando encuentran al antígeno y que conduce a la expresión de las moléculas de coestimulación. Sin activación, las CPA no pueden activar a los linfocitos T CD4⁺ por lo que el estudio de este proceso es muy significativo, ya que determina la iniciación de la respuesta inmune adaptativa.

Los linfocitos B son las células de la inmunidad adaptativa encargadas de secretar anticuerpos que reconocen al antígeno invasor y promueven su eliminación por diversos mecanismos. Clásicamente, ésta ha sido reconocida

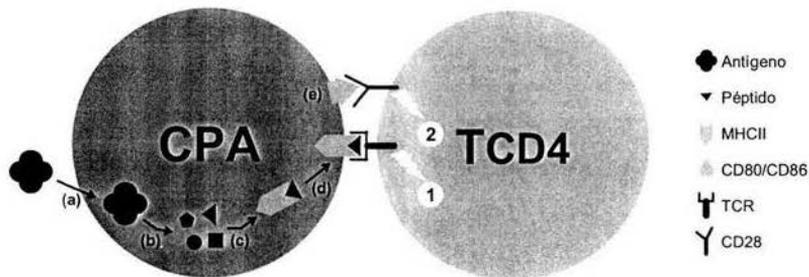


Figura 1. Activación de los linfocitos T CD4⁺ por las CPA. Para poder activar a los linfocitos T CD4⁺, las CPA deben internalizar el antígeno (a) y procesarlo hacia péptidos (b) que se unen a moléculas de MHCII (c) y salen a la superficie (d). También deben expresar moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) (e). El complejo péptido-MHCII genera la señal de activación 1 al unirse al TCR, mientras que las moléculas coestimuladoras generan la señal de activación 2 al unirse a su receptor CD28.

como su función primaria. Sin embargo, también son CPA capaces de activar a los linfocitos T CD4⁺ [3-6] y, por lo tanto, de participar en la iniciación y expansión de la respuesta inmune adaptativa. Esta función ha recibido menos atención debido a que su activación depende de la ayuda del linfocito T CD4⁺ activado [7], por medio de la vía de coestimulación CD154-CD40, como se describirá con detalle más adelante. Esto implica que la activación inicial de los linfocitos T CD4⁺ debe ser llevada a cabo por otros tipos de CPA. Este hecho ha relegado a la función presentadora de antígenos del linfocito B a un papel secundario. Sin embargo, dada la complejidad de las interacciones celulares en el sistema inmune y la inmensa variedad de antígenos que pueden provocar respuestas relevantes, el estudio del papel del linfocito B como CPA garantiza la elucidación de mecanismos importantes en la generación de respuestas inmunes [8]. Por lo tanto, en el presente trabajo, se tratará de comprobar si la función presentadora de antígenos del linfocito B puede llevarse a cabo *in vivo* en ausencia de otras CPA y de establecer la importancia de la vía CD154-CD40 en este proceso.

A continuación se proporcionará un panorama del conocimiento actual sobre la función presentadora de antígenos de los linfocitos B. En primer lugar se

describirá algunas características que los diferencian de otras CPA: su localización, el mecanismo por el cual endocitan antígenos y su manera de procesarlos. Luego se revisará el proceso de activación que deben sufrir para convertirse en CPA, haciéndose énfasis en la contribución de la vía de coestimulación CD154-CD40. Por último, se resumirá estudios que establecen la importancia del linfocito B como CPA en dos situaciones relevantes: la autoinmunidad y las vacunas.

1.1. Localización: ¿Dónde se encuentran los linfocitos B y T CD4⁺?

La presentación de antígenos por las CPA a los linfocitos T CD4⁺ se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios: nódulos linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas. Tanto los linfocitos B como los linfocitos T CD4⁺ vírgenes circulan constantemente por la sangre y la linfa y salen hacia los órganos linfoides secundarios donde encuentran al antígeno para el cual son específicos. Esta salida es regulada por gradientes químicos que determinan la formación de zonas para cada uno de ellos. Las "zonas B" están formadas por los folículos linfoides y carecen de linfocitos T vírgenes, mientras que en las "zonas T" no residen linfocitos B [9,10]. Debido a esta distribución, el encuentro de un linfocito B con un linfocito T CD4⁺ para que se produzca la presentación del antígeno se ha visto como un evento improbable [7]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los linfocitos B y T CD4⁺ pueden encontrarse dentro de los nódulos linfáticos poco después de la administración del antígeno. Garside y colaboradores visualizaron el movimiento de linfocitos específicos para un antígeno modelo. Observaron que después de la entrada del antígeno, se produjo una proliferación de los linfocitos T CD4⁺ inducida por CD residentes en la zona T. Un día después observaron movimiento de los linfocitos T CD4⁺ y B hacia los bordes de los folículos linfoides, donde ambos tipos de células interaccionaron y proliferaron de una manera antígeno-específica [11]. Otros estudios [9,12,13] han establecido que los linfocitos B y T CD4⁺ pueden encontrarse en cuestión de horas y que estos movimientos direccionados dependen de quimiocinas que se secretan ante la

presencia del antígeno, conduciendo a interacciones duraderas (más de una hora) entre las dos células. La visualización de las interacciones de los linfocitos B y T CD4⁺ en estos trabajos determina que el encuentro entre las dos células en etapas tempranas de la respuesta inmune es posible y apoya la función del linfocito B como CPA.

1.2. Endocitosis del antígeno mediada por el receptor de células B

Las CPA pueden endocitar al antígeno por tres procesos: fagocitosis, pinocitosis de fase fluida y endocitosis mediada por receptores. El linfocito B puede usar los dos últimos, aunque la eficiencia del proceso es muy diferente. Esto se debe a que para llevar a cabo la endocitosis mediada por receptor el linfocito B cuenta con un receptor de muy alta afinidad para un antígeno particular: el receptor de células B (BCR). Esta molécula es una inmunoglobulina de membrana que permite concentrar pequeñas cantidades del antígeno para el cual es específico. La importancia de este proceso en la presentación de antígeno fue demostrada por Batista y Neuberger, quienes utilizando líneas celulares de linfocitos B que expresaban BCR de distinta afinidad por el antígeno establecieron que esta afinidad es directamente proporcional a la capacidad del linfocito B para activar a linfocitos T CD4⁺ específicos para el mismo antígeno. Mientras que un BCR de una alta afinidad por el antígeno (K_a de $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) puede activar a los linfocitos T CD4⁺ a concentraciones de antígeno de 0.05 nM, un BCR de afinidad alta, pero menor (K_a de $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) necesita 10 veces más antígeno. Para que exista activación de linfocitos T CD4⁺ por pinocitosis de fase fluida se requiere 5000 veces más concentración. Haciendo mutaciones del antígeno para variar la afinidad de la interacción, calcularon que un BCR de una K_a en el orden de 10^6 M^{-1} puede tener presentación más eficiente que la dada por pinocitosis de fase fluida [14]. En conclusión, el linfocito B cuenta con un mecanismo de endocitosis que le permite concentrar y presentar el antígeno muy eficientemente,

característica que se relaciona directamente con su capacidad de activar a los linfocitos T CD4⁺.

1.3. Procesamiento del antígeno

El procesamiento del antígeno para presentación por MHCII sigue vías comunes para todas las CPA. Los antígenos internalizados en endosomas transitan por la vía endocítica a través de compartimientos progresivamente más ácidos, en donde actúan enzimas que fragmentan el antígeno en péptidos que serán presentados a los linfocitos T CD4⁺. Por otro lado, las MHCII se sintetizan en el retículo endoplásmico y entran a la vía endocítica junto con una molécula chaperona llamada cadena invariante, que ocupa la hendidura de la molécula donde deberán unirse los péptidos. Las MHCII y los péptidos se encuentran en compartimientos especiales denominados MIIC, donde se lleva a cabo la carga de péptidos en las MHCII. Este proceso requiere el intercambio del fragmento de cadena invariante por un péptido del antígeno, paso catalizado por la molécula HLA-DM. Una vez conformados los complejos péptido-MHCII, éstos se dirigen a la superficie para interactuar con los linfocitos T CD4⁺ capaces de reconocerlos [15,16]. Se conocen dos particularidades del linfocito B en relación a otras CPA en este proceso: 1) la dirección de sus componentes mediada por el BCR; y 2) la expresión de HLA-DO, molécula que modula la función de HLA-DM.

Además de la alta afinidad con la que internaliza el antígeno gracias a su región extracelular, el BCR genera señales hacia el interior de la célula que son esenciales para la activación del linfocito B, como se revisará posteriormente. En relación al procesamiento de antígeno, éstas señales producen varios cambios que facilitan el tráfico de los distintos componentes mencionados y la generación de complejos péptido-MHCII. En primer lugar, la ligación del BCR estimula su internalización y conduce al complejo BCR-antígeno por la vía endocítica hasta los MIIC. Así mismo, se ha comprobado que las señales del BCR inducen un aumento

de la síntesis de MHCII y su tráfico por la misma vía que usa el complejo BCR-antígeno. El BCR también es fundamental para dos cambios en el MIIC necesarios para su actividad: su acidificación y la formación de estructuras llamadas cuerpos multivesiculares [17-20]. De esta manera, el linfocito B acopla el reconocimiento del antígeno a la maquinaria encargada de su procesamiento, favoreciendo su presentación por sobre la de otros antígenos internalizados por pinocitosis de fase fluida.

La segunda característica constituye una interesante diferencia molecular entre el linfocito B y otras CPA: la expresión de HLA-DO. Esta es una MHCII no clásica que se expresa únicamente en el epitelio tímico y los linfocitos B. Su función consiste en inhibir la acción de HLA-DM en el intercambio del fragmento de cadena invariante con péptidos antigénicos descrito anteriormente. HLA-DO ejerce su acción en compartimientos de pH relativamente alto, y deja de actuar a pH ácido. Esto conlleva a que en el linfocito B la carga de péptidos a MHCII se restringe más que en otras CPA dependiendo del pH. Se ha propuesto que, debido a que la interacción del BCR con su antígeno es muy estable y por lo tanto su separación también se da solamente a pH muy bajo, esto favorece la presentación de antígenos que fueron internalizados por el BCR [21,22].

1.4. Proceso de activación

Los datos revisados hasta el momento muestran al linfocito B como una CPA muy eficiente para presentar el antígeno para el cual es específico. La entrada de éste sería suficiente para que el linfocito B active a linfocitos T CD4⁺ específicos para el mismo antígeno y se inicie una respuesta inmune. Sin embargo, la probabilidad de que esto suceda de forma rápida es pequeña, debido a que la frecuencia de un linfocito B con un BCR particular es muy baja [8]. Así, después de la entrada del antígeno, se necesita que las clonas de linfocitos B que lo reconocen se expandan

para que contribuyan en la presentación de antígenos al linfocito T CD4⁺. La expansión de cada clona, así como la adquisición de las características de CPA profesionales, necesitan de un proceso de activación cuya iniciación requiere de dos señales: la unión del antígeno al BCR y la ayuda proporcionada por el linfocito T CD4⁺ activado [23].

Como se mencionó, el BCR reconoce al antígeno con su región extracelular, contribuyendo a que la respuesta inmune sea específica. Además, su región intracelular está acoplada a unidades de señalización que, ante el entrecruzamiento de dos BCR por un antígeno polivalente, inician una cascada de señales bioquímicas que culminan en la expresión de diversos genes. Esta constituye la primera señal de activación y es indispensable para que el linfocito B crezca, prolifere, se diferencie y sobreviva. Asimismo, produce numerosos cambios en la maquinaria de procesamiento de antígenos, descritos en el apartado anterior, y estimula la expresión de la molécula coestimuladora CD86 [24,25].

La ayuda del linfocito T CD4⁺ proporciona dos señales adicionales que sinergizan con las del BCR y son indispensables para que la activación se complete: 1) citocinas, principalmente IL-2 e IL-4, que contribuyen a la proliferación y diferenciación; y 2) CD154, molécula de membrana fundamental en la activación del linfocito B, cuya interacción con el receptor CD40 se describirá con detalle a continuación [23].

CD154 es una proteína de membrana homotrimérica que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Se expresa en linfocitos T CD4⁺ activados, plaquetas activadas, células cebadas y basófilos. Como para otras moléculas que participan en la activación de los linfocitos, su expresión está estrechamente regulada. En linfocitos T CD4⁺, la estimulación del TCR induce la transcripción del gen de CD154, la cual es potenciada y estabilizada por señales derivadas del receptor de coestimulación CD28. Dos horas después de la

estimulación del TCR, se detecta CD154 en la superficie. Su expresión alcanza un pico máximo entre las 8 y 12 horas post-activación y a partir de las 24 horas decrece a niveles basales debido a regulación post-transcripcional [26-33].

Por su parte, CD40 pertenece a la familia de receptores del TNF y se expresa como homotrímero en la membrana de las CPA, así como en otros tipos de células como eosinófilos, linfocitos T CD8⁺, células epiteliales de timo y riñón, queratinocitos y células del endotelio vascular [27]. Su interacción con CD154 induce un cambio conformacional que le permite asociarse a las proteínas adaptadoras TRAF1, 2, 3 y 6. A continuación se activan diversas vías de señalización, entre las que destacan las vías de p38MAPK, JNK, y PI₃-K. La cooperación entre estas vías activa factores transcripcionales de las familias NFκB, AP-1, y ATF2, los cuales participan en la inducción de expresión de genes involucrados en diversos procesos como adhesión, coestimulación, progresión del ciclo celular, inhibición de apoptosis e inducción de diferenciación, entre otros [26,33,34].

En el linfocito B, las señales derivadas de CD40 sinergizan con las del BCR para producir aumento de tamaño, supervivencia, secreción de inmunoglobulinas, y cambio de isotipo de inmunoglobulina [35]. En cuanto a la presentación de antígenos, se ha demostrado que la interacción CD154-CD40 potencia el procesamiento de antígenos [36], aumenta la expresión de MHCII, estabiliza la expresión de CD86 e induce la de CD80 [28,37-39]. Además, reorganiza la distribución de estas moléculas en la membrana plasmática para favorecer la presentación de antígenos [40]. De esta manera, la vía de coestimulación CD154-CD40 produce en el linfocito B varios cambios que en conjunto le proporcionan los elementos necesarios para activar al linfocito T CD4⁺. La importancia de esta interacción se refleja en la ausencia de capacidad presentadora de antígenos de linfocitos B provenientes de ratones deficientes de CD154 [41] ó CD40 [42-44] y después del bloqueo de la interacción con anticuerpos anti-CD154 [11].

En conclusión, la presencia del antígeno inicia la activación del linfocito B hacia CPA, pero es indispensable que se exprese CD154 en los linfocitos T CD4⁺ para que el proceso se complete. Si esto no sucede, el linfocito B al presentar el antígeno, en lugar de activar al linfocito T CD4⁺, induce anergia [41,45-47] (Fig. 2). Este tipo de regulación impide que la función presentadora de antígenos del linfocito B se active de forma descontrolada y evita la generación de respuestas inmunes indeseables [33,48]. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la presentación de antígenos propios por parte de linfocitos B puede conducir a autoinmunidad. Por otro lado, se puede aprovechar la función presentadora de antígenos del linfocito B para generar respuestas protectoras. En los siguientes dos apartados describiremos estas situaciones que, sin duda, son áreas de gran relevancia en la inmunología.

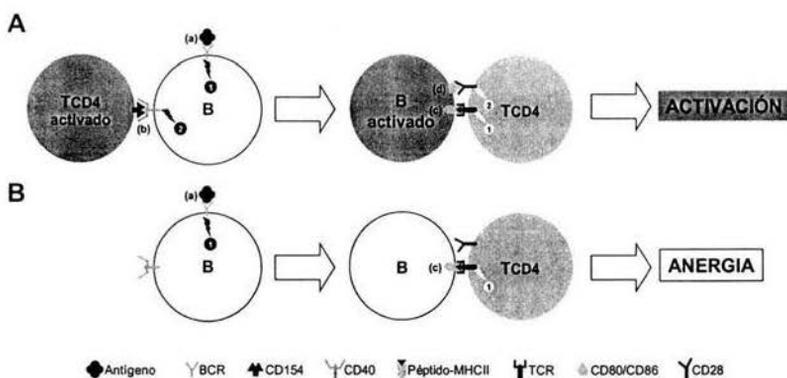


Figura 2. Activación de la función presentadora de antígenos del linfocito B. (A) Para convertirse en CPA el linfocito B necesita de las señal 1 generada por la interacción entre el antígeno y el BCR (a) y la señal 2, desencadenada por la unión de CD154, expresado por los linfocitos T CD4⁺ activados, con el receptor CD40 (b). Este proceso culmina en la expresión del complejo péptido-MHCII (c) y moléculas coestimuladoras (d), elementos necesarios para la activación del linfocito T CD4⁺. (B) Si el linfocito B presenta el antígeno sin haber sido activado por las dos señales induce anergia en el linfocito T CD4⁺.

1.5. Participación del linfocito B como CPA en las enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes constituyen un marco en el que los linfocitos B pueden tener un papel importante como CPA iniciadora. A diferencia de los linfocitos B que, como se describió, se activan al encontrar el antígeno para el cual son específicos, las otras CPA se activan al reconocer en el antígeno patrones moleculares que son extraños al organismo. De esta forma, las CD y los macrófagos no se activan cuando encuentran un antígeno propio, previniéndose la generación de respuestas autoinmunes. Un mecanismo adicional de prevención de estas respuestas indeseables es la eliminación de las clonas de linfocitos T y B que reconocen antígenos propios durante su desarrollo en los órganos linfoides primarios. Sin embargo, esta eliminación no es total y existen clonas autoreactivas en todos los individuos. En condiciones normales, existen varios mecanismos de tolerancia periférica que mantienen a estos linfocitos inactivos, incluyendo la necesidad de moléculas coestimuladoras tanto para linfocitos T como B que se ha descrito y es objeto de este estudio.

En las enfermedades autoinmunes coinciden una serie de factores genéticos y ambientales que conducen a la activación de los linfocitos B y T autorreactivos. En estas circunstancias, es atractivo pensar que un linfocito B autorreactivo puede ser la CPA iniciadora, ya que la presencia del autoantígeno puede iniciar su proceso de activación [49,50]. Así, muchos estudios han abordado este tema en modelos murinos de enfermedad y han comprobado un papel trascendental para los linfocitos B en la presentación de antígenos en varias respuestas autoinmunes.

En el modelo murino de lupus eritematoso sistémico (LES) llamado MRL/lpr, la deficiencia genética de linfocitos B conduce a ausencia de enfermedad. Para disociar la función presentadora de antígenos de la función secretora de anticuerpos, Chan y colaboradores generaron en este fondo genético un ratón con

linfocitos B incapaces de secretar anticuerpos. Observaron que las lesiones de la enfermedad debidas a respuesta inmune celular, como vasculitis y nefritis intersticial, se presentaron en igual magnitud que en ratones MRL/lpr, y que la mortalidad fue mayor en relación a los ratones deficientes de linfocitos B [51]. Este estudio, además de otros realizados con linfocitos B que reconocen antígenos blanco del LES [49,52], sugieren un importante papel para los linfocitos B en la generación de la enfermedad. Estrategias similares aplicadas a la artritis inducida por colágena, modelo de artritis reumatoide, establecieron que la función presentadora de antígenos de los linfocitos B es también fundamental en la generación de esta patología [53,54]. Sorprendentemente, en los ratones diabéticos no obesos (NOD), modelo de la enfermedad humana diabetes tipo I, que es mediada principalmente por inmunidad celular, la función presentadora de antígenos de los linfocitos B también es esencial. La deficiencia de linfocitos B elimina la patología, y por medio de estudios de transferencia de células y anticuerpos o manipulaciones genéticas, varios grupos han demostrado que la importancia del linfocito B se debe a su función como CPA [55-58].

Estos datos apoyan un papel importante para la presentación de antígenos por linfocitos B en la autoinmunidad. Sin embargo, para definirlo mejor deben dilucidarse varios aspectos sobre la capacidad presentadora de antígenos de estas células, algunos de los cuales serán abordados en el presente trabajo.

1.6. El linfocito B como CPA en vacunas

Una de las aplicaciones más importantes de las CPA son las vacunas, en las que activación eficiente de linfocitos T CD4⁺ específicos para antígenos relevantes en enfermedades infecciosas y neoplásicas es altamente deseable. En este campo, se han realizado muchos avances en modelos murinos, en los que las CD han probado ser eficientes CPA. Esto ha llevado a la realización de numerosos estudios en humanos con vacunas terapéuticas para diversos tipos de tumores.

En ellos se han obtenido niveles bajos de inmunidad, por lo que algunos investigadores han puesto atención a otros tipos de CPA, entre ellos los linfocitos B [59].

Los procedimientos para obtener linfocitos B para ser utilizados como CPA en vacunas están siendo determinados, así como distintas maneras para cargarlos con antígenos relevantes. Su activación *ex vivo* a través de CD40 constituye un paso fundamental. Ventajas potenciales de los linfocitos B sobre las CD incluyen la obtención de grandes cantidades a partir de volúmenes pequeños de sangre periférica, así como la generación de poblaciones homogéneas [59-62]. Así, la fase de experimentación clínica con éstas células está cerca y se esperan resultados halagadores.

La participación del linfocito B en las respuestas inducidas por vacunas resalta la necesidad de estudios que definan los mecanismos por los cuales el linfocito B se convierte en una CPA competente, ya que contribuirán al éxito de estas estrategias.

2. JUSTIFICACIÓN

La introducción de este trabajo ha establecido los siguientes puntos:

1. El linfocito B puede activar eficientemente a los linfocitos T CD4⁺ después de su activación.
2. Para activarse, el linfocito B necesita de CD154, molécula expresada por los linfocitos T CD4⁺ activados.

Esto significa que las primeras células en ser activadas deben ser los linfocitos T CD4⁺ y que, por lo tanto, otro tipo de CPA debe ser la encargada de iniciar su activación. De esto se desprende que el linfocito B no puede iniciar respuestas

inmunes por si solo y que se necesita un periodo de activación y expansión de las clonas relevantes de linfocitos T CD4⁺ para que la función presentadora de antígenos del linfocito B se ponga en marcha.

Este modelo concuerda con algunas publicaciones en las que se demuestra que la deficiencia de linfocitos B no es un impedimento para la activación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes [63,64]. Sin embargo, los linfocitos B son capaces de activar a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes tanto *in vitro* [3,5] como *in vivo* [4,6,39,65], y las respuestas inmunes a ciertos antígenos no se llevan a cabo en su ausencia [5,66-68]. Además, como se describió en la introducción, el linfocito B cuenta con ciertas características particulares como CPA que le permiten tener un papel importante en respuestas inmunes relevantes. A pesar de esto, hasta el momento no se ha demostrado que el linfocito B pueda iniciar una respuesta inmune.

Se han utilizado varias estrategias para tratar de demostrar la capacidad del linfocito B para activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes *in vivo*. Estas incluyen direccionamiento del antígeno al linfocito B a través de receptores específicos [4], inyección de antígeno intravenoso a ratones transgénicos para un BCR específico [6] e inyección de linfocitos B cargados con péptidos *ex vivo* [39]. En todos estos estudios se observó activación de linfocitos T CD4⁺, por lo que los autores concluyeron que la CPA responsable era el linfocito B. Sin embargo, en todos los casos existían otros tipos de CPA capaces de presentar el antígeno y no se descartó formalmente que éstas hayan podido tener acceso a éste, por lo que con este tipo de experimentos no se puede concluir que los linfocitos B pueden iniciar la activación de los linfocitos T CD4⁺ por si solos.

Un estudio reciente estableció que los linfocitos B son capaces de activar a linfocitos T CD4⁺ en ausencia de CD. El modelo utilizado consistió en la transfección de linfocitos B *ex vivo* con un transgén para un antígeno, el cual fue presentado *in vivo* a linfocitos T CD4⁺ en ratones *relB*^{-/-}, los cuales carecen de CD derivadas de médula ósea. Aunque estos ratones tienen otras poblaciones de CD

y macrófagos, los autores fueron capaces de probar que el linfocito B era la CPA responsable al realizar los experimentos con linfocitos B deficientes de MHCII, en los cuales no hubo activación de linfocitos T CD4⁺ [65]. Si bien es cierto que este estudio deja claro que el linfocito B puede activar al linfocito T CD4⁺ por sí solo, el antígeno presentado era una proteína endógena codificada por el transgén que de alguna forma llegó a la vía de procesamiento de antígenos de MHCII, por lo que no se evaluó la importancia de la endocitosis mediada por el BCR en éste proceso. Además, los linfocitos B se activaron durante el proceso de transgénesis, y por lo tanto no se evaluaron las vías normales de activación de su función presentadora de antígenos.

Con estos antecedentes, se plantea el estudio de la capacidad del linfocito B para presentar el antígeno y activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes *in vivo* en ausencia de otros tipos de CPA profesionales, y se pretende estudiar el papel que juega la vía de coestimulación CD154-CD40 en este proceso.

3. HIPÓTESIS

3.1 El linfocito B es una CPA competente en ausencia de otros tipos de CPA.

3.2 Durante su proceso de activación, el linfocito B puede inducir la expresión de CD154 en los linfocitos T CD4⁺.

4. OBJETIVOS

4.1 Determinar si el linfocito B puede activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes *in vivo* en ausencia de otras CPA.

4.2 Establecer si cuando no participan otras CPA, la vía de coestimulación CD154-CD40 es necesaria para la activación de la función presentadora de antígenos del linfocito B.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para demostrar las hipótesis planteadas se realizaron experimentos de presentación del antígeno lisozima de gallina (LG) *in vivo* utilizando un modelo de transferencia de linfocitos B y T CD4⁺ de ratones transgénicos a ratones deficientes de linfocitos (Rag2^{-/-}) (Fig. 3). Los ratones donadores de linfocitos B (MD4) expresan un transgén para un BCR anti-LG, mientras que los donadores de linfocitos T CD4⁺ (3A9) expresan un transgén para un TCR que reconoce un péptido de la LG unido a la MHCII IA^k (pLG-IA^k). Estos ratones son del haplotipo H2^k, mientras que los ratones receptores son del haplotipo H2^b. De esta forma, los linfocitos B transferidos son las únicas CPA presentes en el ratón receptor que expresan la molécula IA^k y, por lo tanto, las únicas capaces de presentar el antígeno a los linfocitos T CD4⁺ transferidos. Así, después de inmunizar con el antígeno relevante y aislar las células del bazo, se analizaron varios parámetros por citometría de flujo para determinar la capacidad presentadora de antígenos del linfocito B en ausencia de otros tipos de CPA. (Fig. 4). Para explorar algunos puntos adicionales se hicieron algunas variantes de esta estrategia básica, aspectos que serán detallados en la sección de resultados.

Para explorar la participación de la vía de coestimulación CD154-CD40 en el proceso de activación del linfocito B en este modelo, se cruzaron a los ratones donadores de linfocitos B y T CD4⁺ con ratones deficientes de CD40 y CD154, respectivamente, y se hicieron experimentos similares a los ya descritos.

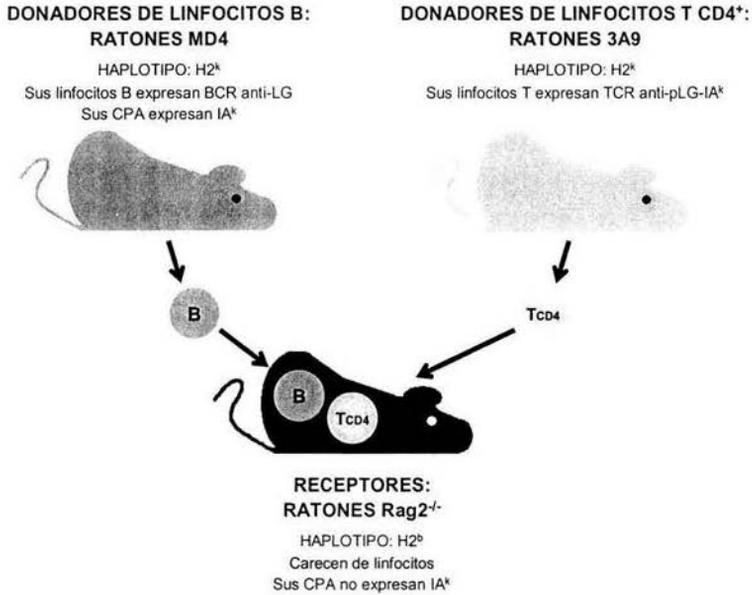


Figura 3. Transferencia de linfocitos B y T CD4⁺ transgénicos a ratones deficientes de linfocitos. Ver el texto para detalles.

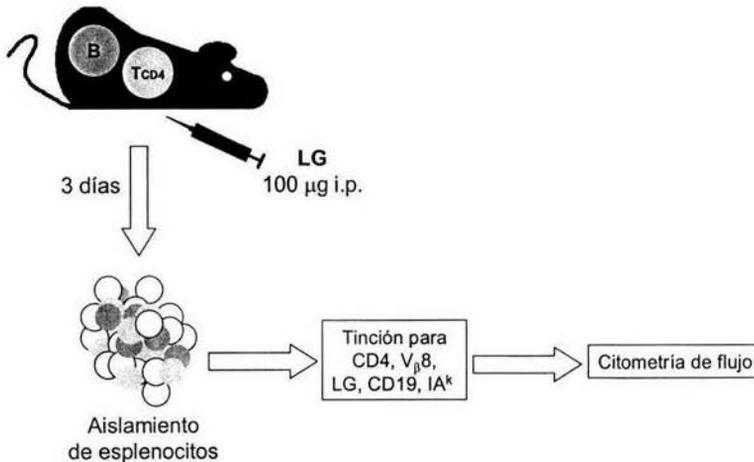


Figura 4. Estrategia utilizada después de la transferencia. Ver el texto para detalles.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Ratones

Los ratones utilizados en este trabajo fueron mantenidos en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM en condiciones libres de patógenos y manipulados de acuerdo a las normas establecidas. En este trabajo se utilizaron siete tipos de ratones, los cuales fueron donadores o receptores de linfocitos en los experimentos de transferencia descritos en la sección anterior. A continuación proporcionamos una descripción breve de cada tipo de ratón. Las combinaciones utilizadas para cada experimento se detallarán en la sección de resultados.

6.1.1. B10.BR: es la cepa silvestre de haplotipo H2^k que fue utilizada para cruzar al resto de ratones. También se utilizaron como donadores de linfocitos B y como receptores en algunos experimentos.

6.1.2. MD4: contienen un transgén para un BCR que reconoce a la LG. La gran mayoría de los linfocitos B de estos ratones expresan este BCR (Fig. 5A) y las inmunoglobulinas que secretan son de clase IgM [69]. Fueron adquiridos de Jackson Laboratories en el haplotipo H2^b. Se cruzaron con ratones B10.BR y en la segunda generación se seleccionaron ratones homocigotos para la molécula IA^k haciendo tinción de leucocitos de sangre periférica para esta molécula. Los ratones MD4 fueron mantenidos cruzando un macho MD4 con una hembra B10.BR y seleccionando los ratones transgénicos por tinción de leucocitos de sangre periférica con LG marcada con FITC, la cual se une al BCR transgénico (Fig. 5A). Se utilizaron como donadores de linfocitos B y como receptores.

6.1.3. 3A9: son transgénicos para un TCR que reconoce un péptido conformado por los aminoácidos 48-62 de la LG unido a la MHCII IA^k (pLG-IA^k). Este TCR utiliza el segmento variable V_β8, lo que permite identificar las células que lo expresan con el anticuerpo F23.1, específico para dicho segmento. Más del

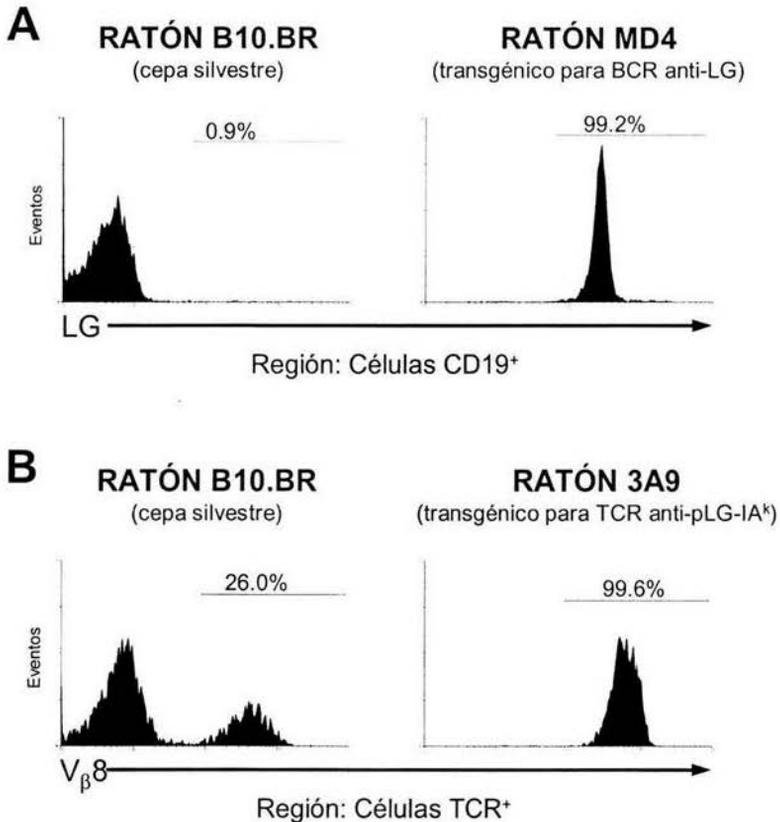


Figura 5. Expresión de receptores transgénicos en ratones MD4 y 3A9. Leucocitos de sangre periférica de ratones MD4 y 3A9 fueron teñidos con anti-CD19 y LG y anti-TCR y anti-V_β8, respectivamente, y analizados por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células positivas para LG en la región CD19⁺ de ratones B10.BR y MD4. **(B)** Porcentaje de células positivas para V_β8 en la región TCR⁺ de ratones B10.BR y 3A9.

99% de los linfocitos T de los ratones 3A9 expresan el segmento V_β8 (Fig. 5B). No contamos con un anticuerpo capaz de reconocer el clonotipo del TCR transgénico, por lo que no pudimos estimar directamente la proporción de linfocitos T que lo expresan. Sin embargo, en la descripción original de estos ratones se demuestra que la gran mayoría de los linfocitos T CD4⁺ lo hacen [46]. Los ratones 3A9, así como el hibridoma productor de anticuerpo F23.1, fueron donados por el Dr. Dario

Vignali (St. Jude's Children Hospital, Memphis, TN, USA) Los ratones se encontraban en el fondo genético C3H, de haplotipo H2^k. Fueron cruzados por varias generaciones con ratones B10.BR y mantenidos cruzando un macho 3A9 con una hembra B10.BR. Se seleccionaron a los ratones transgénicos por tinción de leucocitos de sangre periférica con anticuerpos anti-TCR y anti-V β 8 (Fig. 5B). Fueron utilizados como donadores de linfocitos T CD4⁺.

6.1.4. Rag2^{-/-}: Ratones deficientes de la recombinasa Rag2 que no pueden rearreglar los genes del BCR ni del TCR. Debido a que la expresión de estos receptores es indispensable para el desarrollo de los linfocitos, estos ratones carecen de estas células. Fueron donados por el Dr. Leopoldo Santos (CINVESTAV). Fueron utilizados en su haplotipo original, H2^b. También se cruzaron con ratones B10.BR hasta obtener ratones homocigotos para IA^k y para la mutación en Rag2, los cuales se utilizaron en algunos experimentos. Se seleccionaron los ratones Rag2^{-/-} haciendo tinción de leucocitos de sangre periférica para los marcadores de linfocitos B220 y CD4. Fueron utilizados como receptores.

6.1.5 CD154^{-/-}: tienen una mutación dirigida en el gen de CD154. Su fenotipo semeja al de humanos con la misma mutación, que consiste en la falta de formación de centros germinales y de cambio de isotipo de anticuerpo, lo cual resulta en una respuesta humoral deficiente [70,71]. El desarrollo de linfocitos T y B en estos ratones es normal. Fueron regalados por el Dr. Leopoldo Flores (CINVESTAV) en el haplotipo H2^b. Para los experimentos, se cruzaron con ratones B10.BR hasta obtener ratones homocigotos para IA^k y luego con ratones 3A9 hasta obtener ratones transgénicos y deficientes de CD154. Los ratones CD154^{-/-} se seleccionaron mediante amplificación del gen por reacción en cadena de la polimerasa de DNA extraído de cola, de acuerdo al protocolo detallado por Jackson Laboratories. Fueron utilizados como donadores de linfocitos T CD4⁺.

6.1.6. CD40^{-/-}: su fenotipo es igual al de los ratones CD154^{-/-} [72]. Fueron donados por el Dr. Jesús Martínez. Su haplotipo original era H2^d, y para los experimentos fueron cruzados con ratones B10.BR y luego MD4, hasta obtener ratones MD4/CD40^{-/-} homocigotos para IA^k. La selección de ratones CD40^{-/-} en estas cruces se hizo por tinción de leucocitos de sangre periférica con anticuerpo anti-CD40. Fueron utilizados como donadores de linfocitos B.

6.1.7. C57BL/6: ratones de haplotipo H2^b (cepa silvestre) que fueron utilizados como donadores de linfocitos B en algunos experimentos. Fueron adquiridos de Jackson Laboratories.

6.2. Purificación de linfocitos

Los linfocitos B y T CD4⁺ se purificaron por selección negativa a partir de células de bazo utilizando el método de separación celular activada por magnetismo (MACS). Este consiste en marcar a las poblaciones de células no deseadas con anticuerpos biotinilados y estreptavidina conjugada a perlas magnéticas. Una vez hecho esto, se pasan las células por una columna colocada en un campo magnético, donde las células marcadas son retenidas, mientras que las células de interés pasan y son recolectadas sin haber sufrido ninguna alteración en el proceso.

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante de los reactivos para MACS (Miltenyi Biotech), y se resume a continuación:

- Se extrajeron las células del bazo de los ratones donadores y se lisaron los eritrocitos con buffer de lisis (NH₄Cl 8.3 mg/mL, KHCO₃ 1mg/mL, NA₂EDTA 0.04 mg/mL; pH 7.4).
- Se resuspendieron las células en buffer de marcaje para MACS (EDTA 0.58 mg/mL en PBS; pH 7.4) a una concentración de 1 x 10⁸/mL.

- Se añadieron los siguientes anticuerpos biotinilados a concentraciones adecuadas previamente determinadas por citometría de flujo:
 - o Para purificar linfocitos B:
 - Anti-CD43 (Pharmingen)
 - Anti-CD8 α (Pharmingen)
 - Anti-CD11b (Pharmingen)
 - o Para purificar linfocitos T CD4⁺:
 - Anti-B220 (Pharmingen)
 - Anti-CD8 α (Pharmingen)
 - Anti-CD11b(Pharmingen)
 - Anti-IA^k (H116.32, purificado en nuestro laboratorio)
 - Anti-IA^k (10.2.16, purificado en nuestro laboratorio)
- Se incubaron a 4°C por 20 minutos y se lavaron dos veces con buffer de marcaje.
- Se resuspendieron en 90 μ l de buffer de marcaje por cada 10⁷ células y se añadieron 10 μ l de estreptavidina conjugada a perlas magnéticas por cada 90 μ l de suspensión.
- Se incubaron a 6°C por 15 minutos y se lavó dos veces con buffer de marcaje.
- Se resuspendieron las células en 3 mL de buffer de separación para MACS (EDTA 0.58 mg/mL, albúmina de suero bovina 5 mg/mL en PBS; pH 7.4).
- Se colocó la columna de separación en el campo magnético y se la preparó lavándola con 3 mL de buffer de separación.
- Se pasó la suspensión de células por la columna y se recolectó la fracción negativa.
- Se lavó la columna con 3 mL de buffer de separación por 3 ocasiones.
- Se lavaron las células con PBS por dos ocasiones y se resuspendieron para tinción con CFSE o para ser transferidas.

Con este protocolo se obtuvo una pureza $\geq 95\%$ de acuerdo a tinción con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD19 para linfocitos T CD4⁺ y B, respectivamente (Fig. 6).

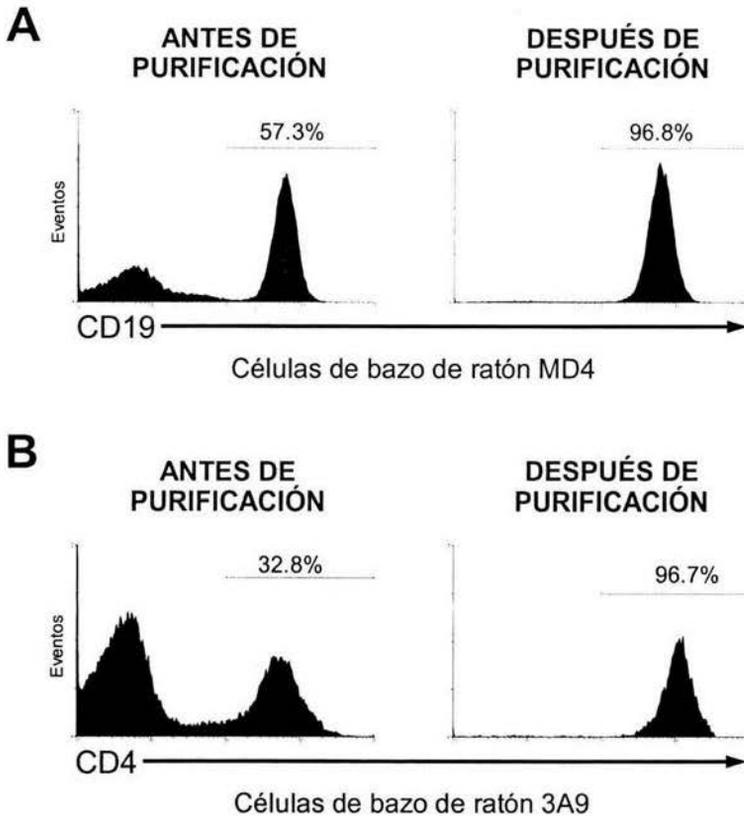


Figura 6. Pureza obtenida después de la purificación de linfocitos de ratones transgénicos por MACS. Células de bazo de ratones MD4 y 3A9 fueron teñidas con anti-CD19 y anti-CD4, respectivamente, antes y después de la purificación. **(A)** Porcentaje de células positivas para CD19 antes y después de purificación de linfocitos B MD4. **(B)** Porcentaje de células positivas para CD4 antes y después de purificación de linfocitos T CD4⁺ 3A9.

6.3. Tinción con carboxifluoresceína (CFSE)

Los linfocitos T CD4⁺ purificados se resuspendieron en PBS con 0.1% de albúmina bovina a una concentración de 1×10^7 células/mL. Se añadió CFSE a una concentración final de 10 mM y se incubaron a 37°C por 10 minutos. Las células se lavaron con PBS por dos ocasiones y se resuspendieron para la transferencia [73].

6.4. Ensayos de transferencia de linfocitos

Los linfocitos purificados fueron suspendidos en PBS e inyectados por vía intravenosa a los ratones receptores. Se transfirieron 3×10^6 linfocitos B y 1×10^6 linfocitos T CD4⁺ en 100 μ L. En algunos experimentos se inyectaron 1×10^7 esplenocitos de ratones 3A9. Un día después se inmunizó a los ratones por vía intraperitoneal con 100 μ g de LG disueltos en 50 μ L de PBS, o el PBS sólo, mezclado con 50 μ L de adyuvante incompleto de Freund. Éste se utilizó para formar agregados del antígeno que puedan entrecruzar a dos o más BCR, ya que la LG es un antígeno monovalente que en forma soluble solo puede ligar a un BCR. Tres días después se aislaron las células del bazo, se lisaron los eritrocitos y se realizó tinción para citometría de flujo o ensayos de producción de citocinas.

6.5. Citometría de flujo

Los esplenocitos procedentes de los ensayos de transferencia fueron teñidos con anticuerpos marcados con fluorocromos siguiendo el procedimiento estándar. Brevemente, las células se resuspendieron en buffer para FACS (NaN₃ 0.5 mg/mL, EDTA 1.5 mg/mL, suero fetal bovino 2%, suero de caballo 2% en PBS, pH 7.4) a una concentración de 1×10^7 células/mL. Se colocaron en placas de 96 pozos (50 μ L por pozo) y se incubaron por 20 minutos a 4°C con las siguientes combinaciones de reactivos primarios:

- anti-CD4-PE, anti-V β 8-biotina y anti-CD69-FITC

- anti-CD4-APC-Cy7, anti-V β 8-biotina y anti-CD62L-PE
- LG-FITC, anti-CD19-PE y anti-IA^k-biotina
- anti-CD80-FITC y anti-CD19-PE
- anti-CD86-FITC y anti-CD19-PE.

Se lavaron las células por 3 ocasiones y se incubaron 20 minutos a 4°C con estreptavidina-PerCP. Después de 3 lavados se transfirieron a tubos de FACS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur.

6.6 Ensayos de producción de citocinas

Para evaluar la producción de citocinas *in vitro* por parte de los linfocitos T CD4⁺, los esplenocitos procedentes de los ensayos de transferencia se incubaron con células de la línea LKD1.3 cargadas con el antígeno. Se escogieron éstas CPA porque son linfocitos B que expresan un BCR específico para LG y la molécula IA^k. Las células LKD1.3 fueron suspendidas a una concentración de 5×10^5 células/mL en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibióticos, y colocadas en placas de 24 pozos (500 μ L por pozo). Se añadió LG para llegar a una concentración final de 10 μ g/mL y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 12 horas. Al final de este periodo, se añadieron 5×10^5 esplenocitos procedentes de los experimentos de transferencia suspendidos en 500 μ L de medio de cultivo, y brefeldina A para llegar a una concentración final de 10 μ g/mL. Se incubaron por 4 horas, luego de las cuales se realizó una tinción con anti-CD4-APC-Cy7 y anti-V β 8-biotina-estreptavidina-PerCP. A continuación, para tinción intracelular de citocinas, se permeabilizaron las células incubándolas con solución Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen) por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados se incubaron con anticuerpos anti-interferón- γ (IFN- γ)-PE ó anti-interleucina-2 (IL-2)-PE, se lavaron tres veces y se analizaron en el citómetro de flujo.

7. RESULTADOS

7.1. Los linfocitos B inducen proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes en ausencia de otras CPA.

Para probar que el linfocito B es una CPA competente *in vivo* en ausencia de otras CPA profesionales, se transfirieron linfocitos T CD4⁺ 3A9 marcados con CFSE junto con linfocitos B MD4 del haplotipo H2^k, a ratones Rag2^{-/-} del haplotipo H2^b. Como se discutió en la sección de estrategia experimental, en estas circunstancias el linfocito B es la única CPA capaz de presentar el antígeno relevante. Un grupo de ratones recibió únicamente los linfocitos T CD4⁺ 3A9, y por lo tanto no contenían CPA que expresen IA^k. Después de 24 horas los animales fueron inmunizados con LG o PBS, y tres días después se sacaron las células del bazo y se realizó tinción para CD4 y el segmento variable del TCR V_β8, expresado por los linfocitos T CD4⁺ transgénicos. La cantidad de linfocitos T CD4⁺ fue significativamente mayor en los ratones que recibieron linfocitos B y antígeno en relación a los grupos control, tanto en el porcentaje de esplenocitos como en el número absoluto de células presentes en el bazo (Fig. 7A y C). La pérdida de fluorescencia de CFSE, que refleja el número de divisiones celulares, también fue mayor en este grupo (Fig. 7B). Estos resultados indican que los linfocitos B son capaces de presentar el antígeno específico e inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes en ausencia de otras CPA.

A pesar de que en los dos grupos control la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 fue menor que en el grupo que recibió linfocitos B MD4 y antígeno, se observaron diferencias importantes entre ellos. El grupo que recibió linfocitos B y PBS sin antígeno presentó una proliferación mayor que el grupo que no recibió linfocitos B (Fig. 7A-C). Esto indica que, en este sistema, los linfocitos B, además de inducir proliferación específica para el antígeno, también inducen un grado menor de proliferación "homeostática" independiente de éste.

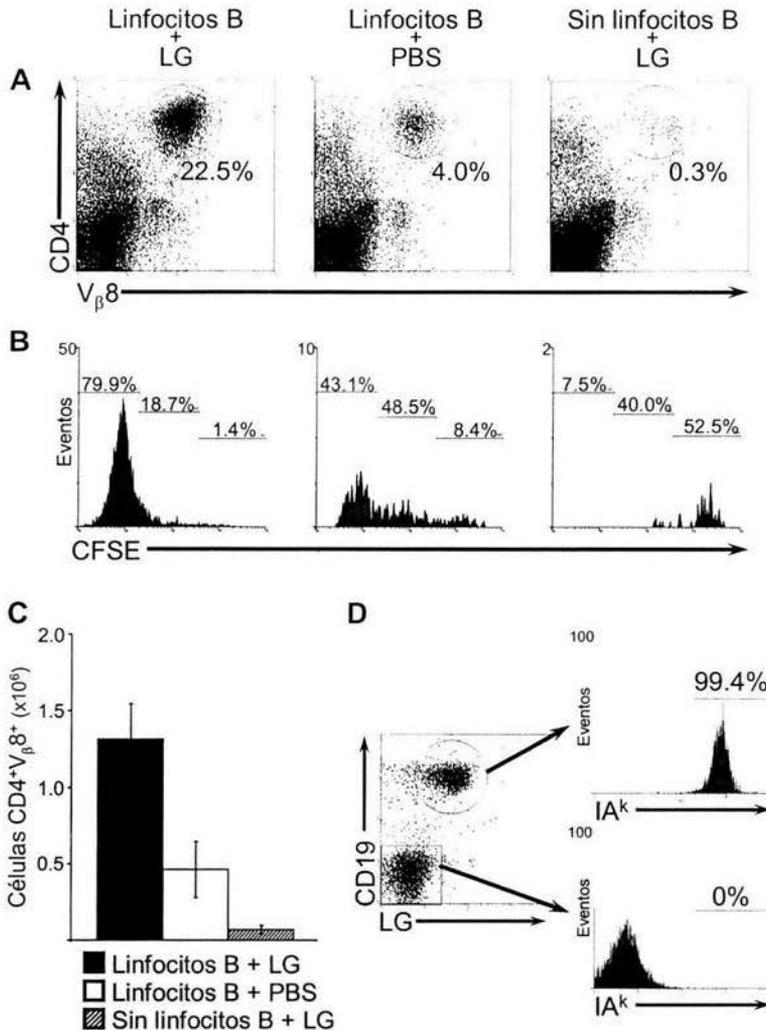


Figura 7. Proliferación de linfocitos T CD4⁺ después de presentación de antígeno por linfocitos B *in vivo*. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 de haplotipo H2^k marcados con CFSE fueron transferidos con o sin linfocitos B MD4 de haplotipo H2^k a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG o PBS y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, LG, anti-CD19 y anti-IA^k y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Expresión de CFSE en las células CD4⁺V_β8⁺. **(C)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(D)** Porcentaje de células IA^k en las células CD19⁺LG⁺ y CD19⁻LG⁻ según las regiones indicadas a la izquierda. **(C)** muestra promedio y desviación estándar de 6 ratones por grupo de 4 experimentos independientes; **(A)**, **(B)** y **(D)** muestran un ratón representativo.

Para comprobar que la presentación de antígenos había sido realizada por los linfocitos B y no por posibles CPA de otro tipo provenientes de los ratones donadores que hayan podido contaminar las poblaciones transferidas, se realizó una tinción para identificar la expresión de la molécula IA^k en el bazo marcando a los esplenocitos con LG conjugada a FITC, que se une al BCR específico de los ratones MD4, y con anticuerpo anti-CD19, un marcador de linfocitos B. Observamos que más del 99% de los linfocitos B transferidos (LG⁺CD19⁺) expresaban niveles altos de IA^k, mientras que el porcentaje de células positivas para esta molécula en el resto de células (LG⁺CD19⁻) fue de 0 a 0.02% (Fig. 7D), niveles de fondo similares a los observados en ratones Rag2^{-/-} de haplotipo H2^b. Estos datos demuestran que los linfocitos B fueron las únicas CPA capaces de formar el complejo péptido-MHCII necesario para activar a los linfocitos T CD4⁺ en este sistema.

7.2 Después de la presentación del antígeno por linfocitos B *in vivo*, los linfocitos T CD4⁺ aumentan la expresión de CD69 y sintetizan citocinas *in vitro*.

Para examinar el estado de activación de los linfocitos T CD4⁺ después de la presentación del antígeno por los linfocitos B, se transfirieron linfocitos B MD4 con linfocitos T CD4⁺ 3A9 o los linfocitos T CD4⁺ sólo a ratones Rag2^{-/-}/H2^b, los cuales fueron inmunizados con LG 24 horas después. Después de 3 días, se sacaron los esplenocitos y se midió la expresión de CD62L y CD69 y la producción de IFN- γ e IL-2 *in vitro*.

Se escogieron las moléculas CD62L y CD69 para evaluar el estado de activación de los linfocitos T CD4⁺ porque su expresión se relaciona con el primer encuentro de estas células con una CPA competente. CD62L se expresa en linfocitos T CD4⁺ vírgenes que no han tenido contacto con el antígeno y su expresión disminuye en las células de memoria. Por su parte, CD69 se expresa

poco después de la interacción con la CPA, por lo que es un marcador de activación temprana. Antes de la transferencia, los linfocitos T CD4⁺ eran CD62L⁺CD69⁻ (Fig. 8A), indicando que en los ratones donadores (que nunca estuvieron en contacto con el antígeno) no había presencia de células activadas y que durante el proceso de purificación no hubo activación alguna. En los esplenocitos recuperados después de la transferencia, las células CD4⁺V β 8⁺ aumentaron sus niveles de CD69 únicamente en los ratones que recibieron linfocitos B. Este cambio se produjo tanto en el porcentaje de células positivas para CD69, como en la intensidad de fluorescencia dada por este marcador (Fig. 8A y C). Los niveles de CD62L no cambiaron en ninguno de los grupos (Fig. 8A).

Para complementar el estudio de la activación de los linfocitos T CD4⁺, se estudió la producción de las citocinas IFN- γ e IL-2 *in vitro* después de re-estimulación con el antígeno, ya que ésta es una de las funciones cardinales de los linfocitos T CD4⁺ después de su activación. Con este fin, se incubaron los esplenocitos procedentes de los ensayos de transferencia con CPA cargadas con el complejo péptido-MCHII relevante. Se escogió como CPA a la línea de linfocitos B LKD1.3 debido a que expresan un BCR de alta afinidad para la LG y la molécula IA^k. Además, por tratarse de células tumorales, expresan las moléculas de coestimulación características de las CPA profesionales. Así, se realizó el ensayo para medir citocinas intracelulares de acuerdo al protocolo detallado en Materiales y Métodos. Los resultados indicaron que únicamente las células CD4⁺V β 8⁺ que estuvieron en contacto con linfocitos B histocompatibles *in vivo* fueron capaces de producir IFN- γ e IL-2 *in vitro*; las células CD4⁺V β 8⁺ que no tuvieron contacto con linfocitos B produjeron cantidades insignificantes de ambas citocinas, a pesar de estar junto a CPA histocompatibles cargadas con el complejo péptido-MHCII relevante *in vitro* (Fig. 8B y C). Esplenocitos incubados con CPA que no fueron cargadas con antígeno no produjeron cantidades significativas de ninguna de las dos citocinas.

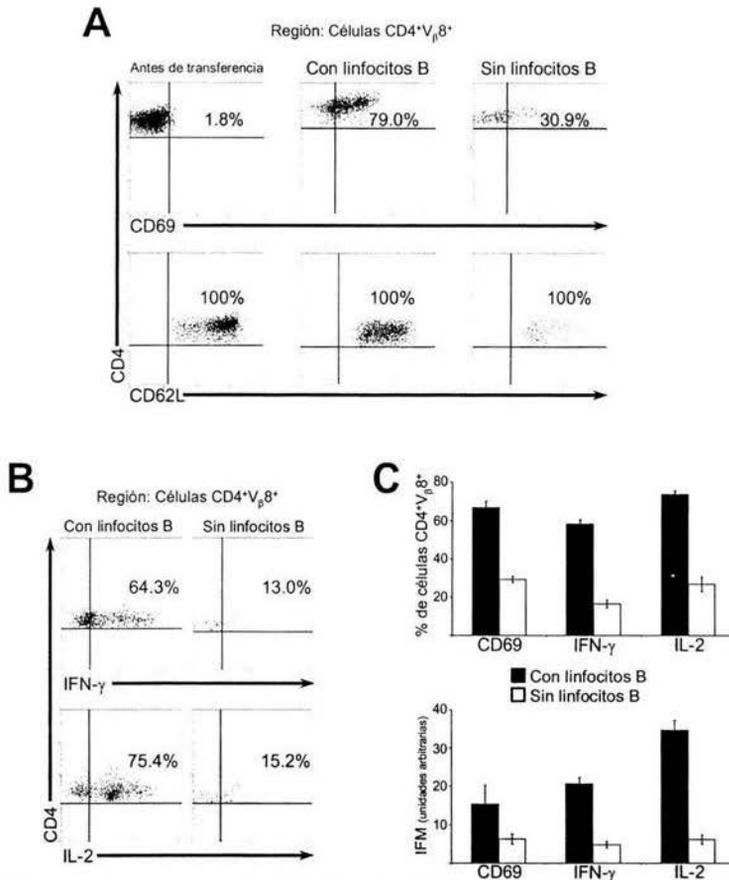


Figura 8. Activación de linfocitos T CD4⁺ después de presentación de antígeno por linfocitos B *in vivo*. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 de haplotipo H2^k fueron transferidos con o sin linfocitos B MD4 de haplotipo H2^k a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas y teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, anti-CD69 y anti-CD62L ó utilizadas para ensayos de producción de citocinas *in vitro* (ver Materiales y Métodos). **(A)** Porcentaje de células positivas para CD69 y CD62L en la región CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Porcentaje de células positivas para IFN-γ y IL-2 en la región CD4⁺V_β8⁺. **(C)** Porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia media (IFM) en la región CD4⁺V_β8⁺ para los marcadores indicados. **(C)** muestra promedio y desviación estándar de 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes; **(A)** y **(B)** muestran un ratón representativo.

Estos resultados indican que la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ inducida por la presentación del antígeno por linfocitos B se asocia a un fenotipo de activación.

7.3. En presencia del antígeno relevante, los linfocitos B proliferan y aumentan la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras.

Para estudiar el estado de activación de los linfocitos B que activaron a los linfocitos T CD4⁺, se realizaron los ensayos de transferencia inmunizando con LG o inyectando sólo PBS mezclado con el adyuvante. Tres días después se realizó tinción para el BCR anti-LG, CD19, IA^k y las moléculas de coestimulación CD80 y CD86. La cantidad de linfocitos B específicos para LG recuperada de los ratones que recibieron esta proteína fue significativamente mayor en relación a los ratones que recibieron PBS, tanto en número absoluto como relativo (Fig. 9A y B). Los linfocitos B que estuvieron en contacto con el antígeno también aumentaron su tamaño (lo cual se refleja en aumento en el valor de dispersión frontal (FSC)), así como la expresión de IA^k, CD80 y CD86 (Fig. 9C). Estos resultados indican que la presencia del antígeno no sólo es esencial para la generación del complejo péptido-MHCII, sino también para la maduración del linfocito B hacia CPA profesional.

7.4. La activación de los linfocitos T CD4⁺ requiere de una población expandida de linfocitos B específicos para el antígeno.

Para determinar si la capacidad de los linfocitos B como CPA en este modelo dependía de la expresión del BCR específico para el antígeno, se realizaron los mismos ensayos de transferencia incluyendo un grupo al que se transfirieron linfocitos B provenientes de ratones de la cepa silvestre B10.BR. Estos ratones contienen el repertorio normal de linfocitos, por lo que la cantidad de linfocitos B

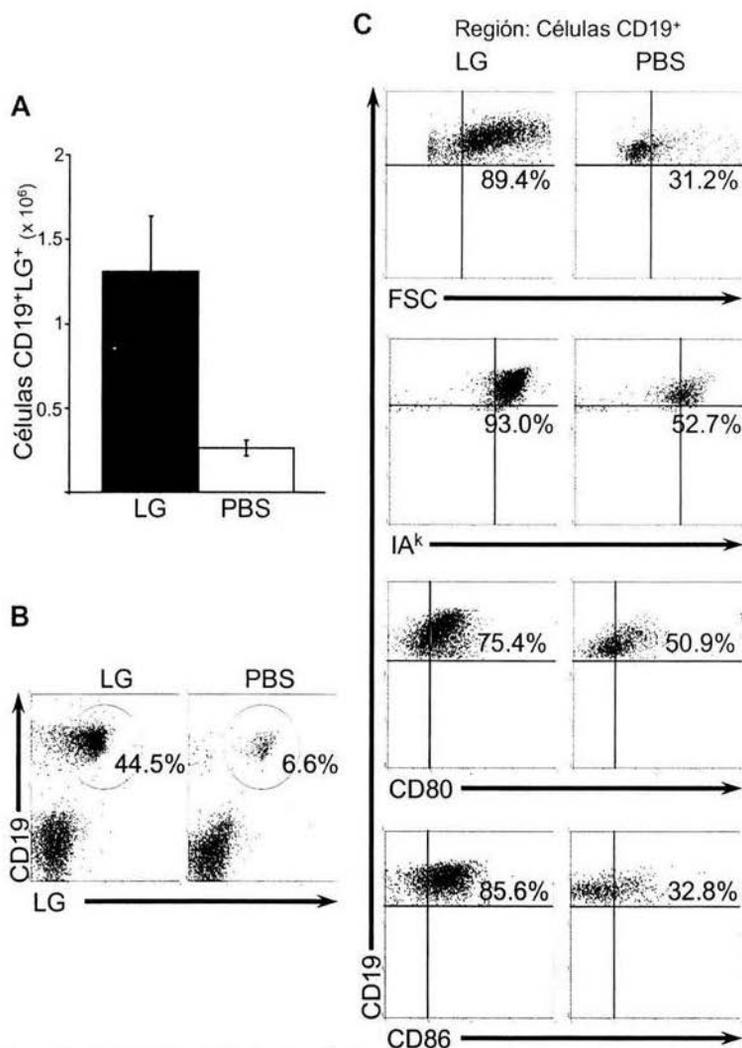


Figura 9. Activación de linfocitos B después de inmunización con el antígeno. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 y linfocitos B MD4 de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG o PBS y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con LG, anti-CD19, anti-IA^k, anti-CD80 y anti-CD86 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD19⁺LG⁺. **(B)** Porcentaje de células CD19⁺LG⁺. **(C)** Porcentaje de células con alta dispersión frontal (FSC), y positivas para IA^k, CD80 y CD86 en la región de células CD19⁺. **(A)** muestra promedio y desviación estándar de 6 ratones por grupo de 4 experimentos independientes; **(B)** y **(C)** muestran un ratón representativo.

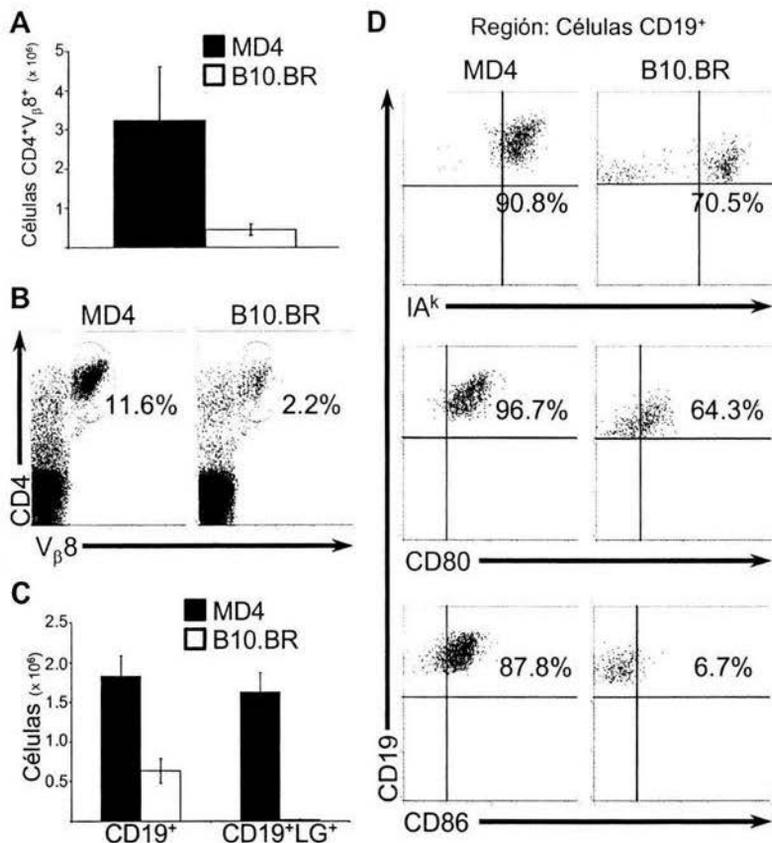


Figura 10. Presentación de antígeno por linfocitos B específicos. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 y linfocitos B MD4 ó B10.BR de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, LG, anti-CD19, anti-IA^k, anti-CD80 y anti-CD86 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Porcentaje de células CD4⁺V_β8⁺. **(C)** Número total de células CD19⁺ y CD19⁺LG⁺. **(D)** Porcentaje de células positivas para IA^k, CD80 y CD86 en la región de células CD19⁺. **(A)** y **(C)** muestran promedio y desviación estándar de 6 ratones por grupo de 3 experimentos independientes; **(B)** y **(D)** muestran un ratón representativo.

con un receptor específico para la LG es muy baja. Los resultados indicaron que la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 se produjo sólo cuando se transfirieron junto con los linfocitos MD4, demostrándose que para que el linfocito B sea una CPA eficiente se necesita de una expansión previa de la clona relevante (Fig. 10A y B). Los linfocitos B B10.BR que no indujeron la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 tampoco sufrieron los cambios necesarios para convertirse en CPA profesionales: proliferación y aumento en la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras (Fig. 10C y D).

Los ensayos anteriores se realizaron transfiriendo 3×10^6 linfocitos B, dosis que fue la utilizada inicialmente y que fue capaz de activar a los linfocitos T CD4⁺. Para determinar la cantidad mínima de linfocitos B específicos para el antígeno necesaria para activar a los linfocitos T CD4⁺ en nuestro sistema, se realizó un experimento transfiriendo una cantidad progresivamente mayor de linfocitos B MD4 mezclados con linfocitos B B10.BR para siempre transferir 3×10^6 linfocitos B en total. Así, los distintos grupos recibieron 0, 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , ó 3×10^6 linfocitos B MD4. En los tres últimos grupos se observó proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9, y ésta se correlacionó con presencia de cantidades importantes de linfocitos B específicos para LG (Fig. 11). Como era de esperarse, el número de linfocitos B que se marcaron con LG fue progresivamente mayor en cada uno de estos grupos, de acuerdo a la cantidad de linfocitos B MD4 que recibieron. Sin embargo, los niveles de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 fueron similares en estos tres grupos, indicando que la cantidad de linfocitos específicos para LG presentes en el bazo del grupo que recibió 5×10^5 fue suficiente para presentar el antígeno con la misma eficiencia que en los grupos que recibieron mayor cantidad. Por otro lado, en el grupo que recibió 2.5×10^5 linfocitos B MD4 se observaron los mismos resultados que en los ratones que sólo recibieron linfocitos B B10.BR: no se observaron niveles significativos de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 y la cantidad de linfocitos B positivos para LG recuperada fue mínima (Fig. 11). En resumen, con la menor dosis probada no se consiguió que los linfocitos B MD4 se distribuyan en los órganos

linfoides secundarios en un número adecuado para que el antígeno sea captado y presentado de manera eficiente; con cantidades mayores de linfocitos B antígeno-específicos la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ fue similar, indicando que cuando la cantidad de linfocitos B específicos para el antígeno rebasa un umbral, los linfocitos T CD4⁺ pueden ser activados de manera eficiente.

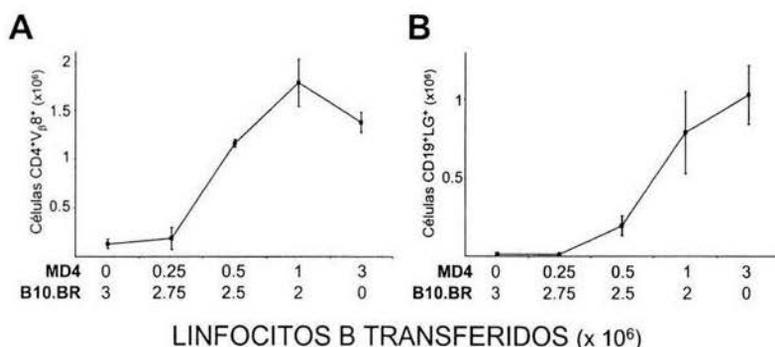


Figura 11. Dosis de linfocitos B específicos para el antígeno necesaria para presentación eficiente. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 y distintas cantidades de linfocitos B MD4 y B10.BR de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, LG y anti-CD19, y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Número total de células CD19⁺LG⁺. Se muestran promedio y desviación estándar de 3 ratones por grupo de un experimento.

7.5 La expresión de MHCII en los linfocitos B es responsable de la proliferación homeostática de los linfocitos T CD4⁺.

La proliferación de linfocitos T CD4⁺ observada en nuestro sistema en los ratones que recibieron linfocitos B pero no antígeno podría explicarse por la expresión en los linfocitos B de la molécula IA^k, ya que la función del MHCII en la proliferación homeostática de los linfocitos T CD4⁺ ha sido probada [74-79]. Para demostrarlo, se realizaron ensayos de transferencia en los que los ratones donadores de linfocitos B fueron C57BL/6, cepa silvestre de haplotipo H2^b. La cantidad de

linfocitos T CD4⁺ 3A9 recuperados de los ratones que recibieron estos linfocitos B fue muy baja, similar a los controles que no recibieron linfocitos B en ensayos anteriores (Fig. 12, comparar con Fig. 7A y C). Linfocitos B MD4 incluidos en los mismos experimentos indujeron niveles de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ similares a los mostrados en secciones anteriores. Estos resultados indican que la expresión de la molécula IA^k en los linfocitos B es la responsable de la proliferación homeostática independiente de antígeno observada en este sistema.

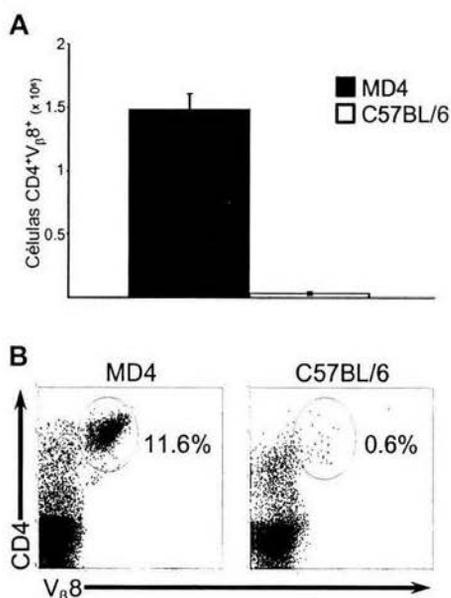


Figura 12. Ausencia de inducción de proliferación de linfocitos T CD4⁺ por linfocitos B de distinto haplotipo. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 y linfocitos B MD4 (H2^k) ó B57BL/6 (H2^b) fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4 y anti-V_β8 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Porcentaje de células CD4⁺V_β8⁺. **(A)** muestra promedio y desviación estándar de 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes; **(B)** muestra un ratón representativo.

7.6. Los linfocitos B pueden inducir proliferación de linfocitos T CD4⁺ en ratones no linfopénicos.

Los linfocitos transferidos a ratones deficientes de linfocitos proliferan de manera importante ya que encuentran vacíos los espacios que les corresponden en los órganos linfoides secundarios y no tienen que competir por recursos con otros linfocitos [74,80,81]. En nuestro sistema experimental se utilizaron ratones deficientes de linfocitos como receptores con el fin de aislar la función del linfocito B de la de otras CPA. Aunque en este contexto la proliferación de linfocitos T CD4⁺ observada sin duda se debe a presentación de antígenos por linfocitos B, no se puede definir la contribución del ambiente linfopénico de los ratones receptores para este fenómeno. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue determinar la capacidad de los linfocitos B de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en un ambiente no linfopénico. Para lograrlo, se utilizaron como receptores ratones histocompatibles, ya que ratones de otro haplotipo con un repertorio normal de linfocitos rechazarían las células transferidas. Sin embargo, como se explicó en la sección de estrategia experimental, en estas circunstancias no se puede aislar la contribución del linfocito B en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de la de otras CPA. Por esta razón, en primer lugar se realizaron ensayos utilizando como receptores a ratones linfopénicos histocompatibles con el fin de determinar la contribución de los otros tipos de CPA en la presentación del antígeno en nuestro modelo.

Después de transferir linfocitos T CD4⁺ 3A9 a ratones Rag2^{-/-} de haplotipo H2^k e inmunizar con LG, se observaron niveles de proliferación mayores a los de la proliferación homeostática observada en ratones que no recibieron el antígeno (Fig. 13A). Esta proliferación también fue mayor a la observada en ratones Rag2^{-/-} de haplotipo H2^b que recibieron únicamente linfocitos T CD4⁺ 3A9 y fueron inmunizados con antígeno (comparar Fig. 13A con 7C). Estas diferencias reflejan la capacidad de CPA diferentes al linfocito B de inducir proliferación de linfocitos T CD4⁺ en nuestro sistema. Sin embargo, estos niveles de proliferación fueron

significativamente menores a los observados luego de transferir linfocitos B MD4 junto con los linfocitos T CD4⁺ 3A9 a ratones Rag2^{-/-}/H2^k e inmunizarlos con LG (Fig. 13A). Esto indica que los linfocitos B son los principales responsables de la activación de los linfocitos T CD4⁺ en este modelo, incluso en presencia de otros tipos de CPA que expresan la molécula IA^k.

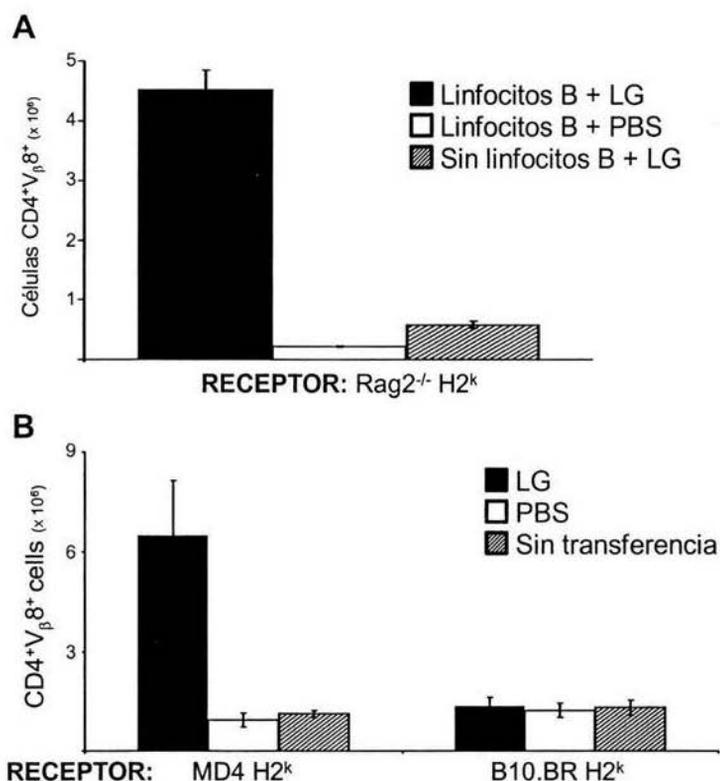


Figura 13. Proliferación de linfocitos T CD4⁺ después de presentación de antígeno en ratones histocompatibles linfopénicos y no linfopénicos. (A) Esplenocitos 3A9 con o sin linfocitos B MD4 de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^k. **(B)** Esplenocitos 3A9 fueron transferidos a ratones MD4 ó B10.BR, ambos H2^k. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG o PBS y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, y anti-V_β8 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** y **(B)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. Se muestran promedio y desviación estándar de 4 ratones por grupo de dos experimentos independientes.

La demostración de que los linfocitos B MD4 son las CPA más importantes en nuestro modelo nos permitió realizar experimentos con ratones no linfopénicos como receptores para evaluar la presentación de antígeno por linfocitos B en un ambiente linfoide normal. En estos experimentos se transfirieron esplenocitos procedentes de ratones 3A9 a ratones MD4 ó B10.BR y se inmunizaron con LG o PBS. Se observó proliferación significativa únicamente en los ratones MD4 que recibieron LG, mientras que no se observaron diferencias en las cantidades de células $CD4^+V_{\beta}8^+$ en ratones MD4 ni B10.BR que recibieron PBS (en los que se representa únicamente proliferación homeostática) ni en ratones B10.BR que recibieron LG (en los que se representa la proliferación inducida por CPA distintas a los linfocitos B) en relación a ratones que no recibieron ningún tratamiento (Fig. 13B). Estos datos indican que los linfocitos B son capaces de inducir proliferación de linfocitos T $CD4^+$ en ratones no linfopénicos, pero que en este contexto no se observa proliferación homeostática.

7.7. La expresión de CD154 en las células T $CD4^+$ y de CD40 en los linfocitos B son esenciales para que los linfocitos B puedan convertirse en CPA competentes.

Debido a que la vía de coestimulación CD154-CD40 participa en la maduración del linfocito B hacia CPA, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el papel de la expresión de CD154 en los linfocitos T $CD4^+$ en nuestro sistema. Para esto se diseñaron ensayos de transferencia en los que los donadores de linfocitos T $CD4^+$ fueron ratones 3A9 ó 3A9/CD154^{-/-}. En ellos se observó que la cantidad de linfocitos T $CD4^+$ recuperados después de la presentación del antígeno por los linfocitos B MD4, tanto en números relativos como absolutos, fue significativamente mayor cuando los linfocitos T $CD4^+$ 3A9 expresaban CD154 (Fig. 14A y B). Esto se relacionó con una expansión de los linfocitos B MD4 co-transferidos (Fig. 14C), así como con la adquisición de las características de CPA competente: expresión elevada de MHCII y moléculas coestimuladoras (Fig. 14D).

Estos datos demuestran que la expresión de CD154 en los linfocitos T CD4⁺ es indispensable para que los linfocitos B maduren como CPA en nuestro sistema. Sin embargo, estos ensayos no permiten establecer si la ausencia de expresión de CD154 en los linfocitos T CD4⁺ puede tener algún efecto en su respuesta ante la presentación del antígeno. Por lo tanto, se realizó el experimento inverso: transferencia de linfocitos B MD4 ó MD4/CD40^{-/-} junto con los linfocitos T CD4⁺ 3A9. Cuando la CPA del sistema era CD40^{-/-}, se observaron resultados similares a los obtenidos cuando CD154 estaba ausente en los linfocitos T CD4⁺: falta de proliferación tanto de los linfocitos T CD4⁺ 3A9 (Fig. 15A y B) como de los linfocitos B MD4 (Fig. 15C) y falta de aumento de expresión de MHCII, CD80 y CD86 en los linfocitos B (Fig. 15D). Con estos experimentos se demuestra que la falta de maduración de los linfocitos B a través de CD40 impide la activación de linfocitos T CD4⁺, aunque estos sean capaces de expresar CD154.

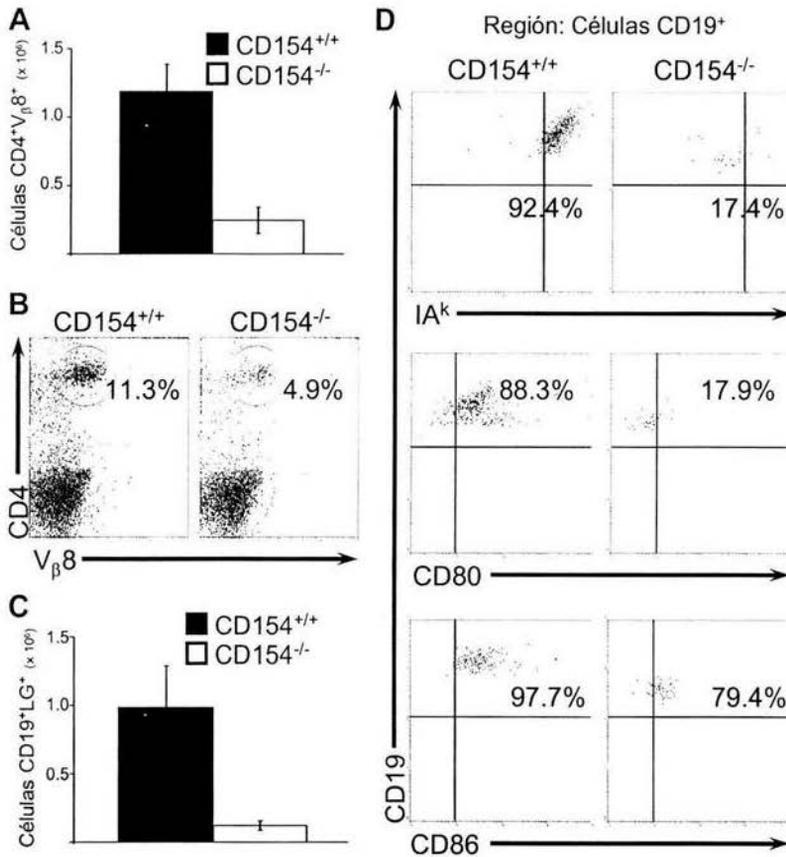


Figura 14. Necesidad de expresión de CD154 en los linfocitos T CD4⁺ para la función presentadora de antígenos de los linfocitos B. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 CD154^{+/+} ó CD154^{-/-} y linfocitos B MD4 de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, LG, anti-CD19, anti-IA^k, anti-CD80 y anti-CD86 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Porcentaje de células CD4⁺V_β8⁺. **(C)** Número total de células CD19⁺LG⁺. **(D)** Porcentaje de células positivas para IA^k, CD80 y CD86 en la región de células CD19⁺. **(A)** y **(C)** muestran promedio y desviación estándar de 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes; **(B)** y **(D)** muestran un ratón representativo.

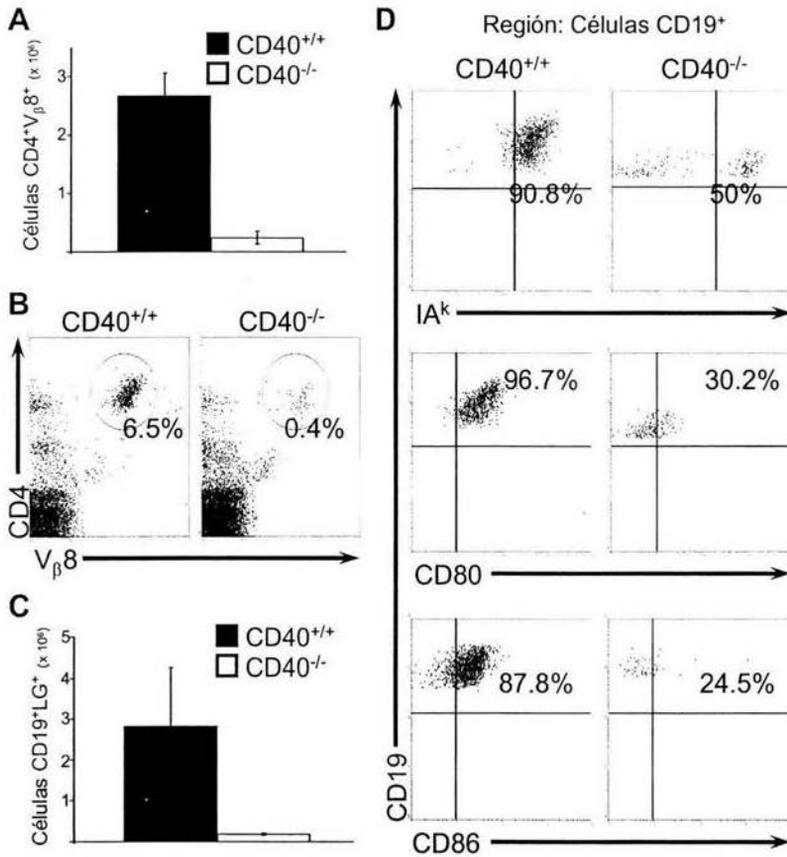


Figura 15. Necesidad de expresión de CD4 en los linfocitos B para la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺. Linfocitos T CD4⁺ 3A9 y linfocitos B MD4 CD4^{+/+} ó CD4^{-/-} de haplotipo H2^k fueron transferidos a ratones Rag2^{-/-}/H2^b. Un día después los ratones fueron inmunizados con LG y tres días después las células del bazo fueron aisladas, teñidas con anti-CD4, anti-V_β8, LG, anti-CD19, anti-IA^k, anti-CD80 y anti-CD86 y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Número total de células CD4⁺V_β8⁺. **(B)** Porcentaje de células CD4⁺V_β8⁺. **(C)** Número total de células CD19⁺LG⁺. **(D)** Porcentaje de células positivas para IA^k, CD80 y CD86 en la región de células CD19⁺. **(A)** y **(C)** muestran promedio y desviación estándar de 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes; **(B)** y **(D)** muestran un ratón representativo.

8. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

8.1. Los linfocitos B pueden activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes en ausencia de otras CPA profesionales.

Los ensayos de transferencia utilizados en este trabajo fueron diseñados para aislar la función presentadora de antígenos de los linfocitos B de la de otros tipos de CPA profesionales y para incrementar las posibilidades de que los linfocitos B encuentren al antígeno y a linfocitos T CD4⁺ específicos para éste. En este contexto, se observó que los linfocitos B son capaces de activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes *in vivo* sin la necesidad de interacción previa con otros tipos de CPA profesionales. La activación de los linfocitos T CD4⁺ se reflejó en varios parámetros: proliferación, aumento de la expresión del marcador de activación temprana CD69 y producción de las citocinas IL-2 e IFN- γ *in vitro* después de re-estimulación con el antígeno (Fig. 7 y 8). Este hallazgo representa la contribución más importante de este trabajo, ya que es el primer modelo en el que se puede establecer este hecho para la presentación de un antígeno exógeno.

Una de las limitaciones del modelo utilizado fue la transferencia de linfocitos a un ambiente linfopénico en donde pueden proliferar sin competencia [74,80,81]. El uso de ratones deficientes de linfocitos de un haplotipo distinto al de los linfocitos B permitió tener un ambiente en el que ninguna otra CPA expresara la MHCII necesaria para activar a los linfocitos T CD4⁺ transgénicos que se utilizaron. Además, al carecer de linfocitos, éstos ratones no pueden rechazar las células transferidas aunque sean de un haplotipo diferente. No era posible lograr estas condiciones al usar ratones con un número normal de linfocitos como receptores: el uso de ratones histocompatibles no permitiría disociar la función presentadora de antígenos del linfocito B de la de otros tipos de CPA, y el uso de ratones de otro haplotipo hubiera desencadenado el rechazo de las células incompatibles. Para poder comprobar si la presentación de antígenos por el linfocito B podía

realizarse en un ambiente no linfopénico, en primer lugar se estableció que en este sistema el linfocito B es la CPA más apta para presentar el antígeno (Fig. 13A). Este hecho concuerda con datos publicados anteriormente que demuestran que la LG es un antígeno que es presentado muy eficientemente por linfocitos B específicos y pobremente por las CD [82]. Este resultado permitió realizar experimentos de transferencia utilizando ratones no linfopénicos como receptores. En ellos se observó que los linfocitos B son capaces de activar a linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Fig. 13B). Estos datos concuerdan con modelos previos en los que se demuestra presentación de antígenos por linfocitos B *in vivo*, pero en ellos es imposible disociar la contribución de los otros tipos de CPA. No obstante, creemos que estos experimentos refuerzan nuestras observaciones iniciales porque demuestran que el ambiente linfopénico no es un factor determinante en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ inducida por linfocitos B en ausencia de otros tipos de CPA.

8.2. La función presentadora de antígenos de los linfocitos B depende de su proliferación y de aumento en la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras.

Para ser una CPA eficaz, el linfocito B debe sufrir un proceso de activación, el cual consiste en proliferación, crecimiento, aumento de la expresión de MHCII e inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras. Al explorar el estado de activación de los linfocitos B en nuestros ensayos de transferencia tres días después de administrar el antígeno, se observó que se habían producido todos estos cambios (Fig. 9). Por su parte, en los ratones que no recibieron el antígeno los linfocitos B no se activaron, lo cual indica que la capacidad presentadora de antígeno de los linfocitos B en este modelo está directamente relacionada a la presencia de su antígeno específico, la cual, como es conocido, contribuye a éstos cambios a través de la generación de señales por el BCR.

8.3. Para conseguir una activación eficiente de linfocitos T CD4⁺ se necesita de una población expandida de linfocitos B específica para el antígeno.

Con el primer grupo de ensayos realizados se concluyó que los linfocitos B son capaces de activar a los linfocitos T CD4⁺ sin la participación de otros tipos de CPA. Sin embargo, al transferir linfocitos B provenientes de ratones transgénicos que expresan un BCR específico para el antígeno a ser presentado, no se refleja la frecuencia de linfocitos B específica para determinado antígeno presente en el repertorio normal, la cual no se conoce con exactitud pero se sabe es muy baja. Como se mencionó, los linfocitos transgénicos se utilizaron para aumentar la probabilidad de encuentro con el antígeno y con los linfocitos T CD4⁺. Para establecer la importancia que tuvo en nuestro modelo la presencia de una población de linfocitos B específica para el antígeno, se realizaron ensayos con linfocitos B provenientes de ratones silvestres, los cuales tienen un repertorio de linfocitos normal. En ellos, se observó claramente que, en este modelo, para activar a los linfocitos T CD4⁺ es indispensable la presencia de una población previamente expandida de linfocitos B específicos para el antígeno (Fig. 10 y 11). La falta de función presentadora de antígenos de los linfocitos B provenientes de ratones silvestres se relacionó con falta de activación de los mismos. Estos resultados nos permiten concluir que la expansión clonal que tiene lugar después del primer encuentro del linfocito B con el antígeno es un paso fundamental para que los linfocitos B puedan contribuir como CPA en la iniciación de respuestas inmunes.

8.4. La proliferación homeostática de los linfocitos T CD4⁺ puede ser inducida por la expresión de MHCII en los linfocitos B.

Para que los linfocitos T CD4⁺ proliferen, fue necesaria la co-transferencia de linfocitos B y la inmunización con el antígeno, ya que la falta de una de estas dos

condiciones resultó en una proliferación significativamente más baja. Sin embargo, entre los grupos control estudiados, también se encontró una diferencia: la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ fue mayor cuando se transfirieron junto con linfocitos B en comparación a cuando se transfirieron solos (Fig. 7). Varios estudios demuestran que las MHCII son responsables de este tipo de proliferación homeostática [74-79]. En nuestro modelo, la transferencia de linfocitos T CD4⁺ 3A9 solos a ratones Rag2^{-/-} de haplotipo H2^b resultó en la ausencia de MHCII del haplotipo adecuado que puedan inducir la proliferación homeostática. El hecho de que se haya encontrado esta proliferación en ratones que además recibieron linfocitos B histocompatibles, pero no el antígeno, sugirió fuertemente que en nuestro sistema los linfocitos B podían inducir proliferación homeostática de los linfocitos T CD4⁺ gracias a la expresión de las moléculas de MHCII relevantes. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron los ensayos de transferencia utilizando linfocitos B silvestres que no expresan el MHCII reconocido por el TCR de los linfocitos T CD4⁺ 3A9. En ellos, los linfocitos T CD4⁺ no iban a encontrar a moléculas de MHCII compatibles, a pesar de haber sido co-transferidos linfocitos B. La falta de proliferación en este contexto (Fig. 12) demuestra que la proliferación homeostática observada en los ensayos anteriores se debe a la expresión de MHCII por los linfocitos B.

8.5. La interacción CD154-CD40 es indispensable para la activación de la función presentadora de antígenos de los linfocitos B.

La activación de la función presentadora de antígenos del linfocito B requiere de señales iniciadas por dos receptores: el BCR y CD40. En el modelo estudiado, la activación del linfocito B y su capacidad de activar a los linfocitos T CD4⁺ indican que los ligandos de estos receptores, el antígeno y CD154, respectivamente, estuvieron presentes. Sin embargo, CD154 es una molécula expresada en los linfocitos T CD4⁺ activados, y, en este caso, estas células no habían recibido

ninguna señal previa para activarse. Este fenómeno puede explicarse de varias maneras:

1. Las señales provenientes de CD40 podrían no ser indispensables para que se active la función presentadora de antígenos de los linfocitos B en nuestro sistema. Señales derivadas de receptores del sistema inmune innato que se expresan en los linfocitos B, como los receptores tipo Toll (TLR) 4 y 9, pueden proporcionar la segunda señal de activación [83,84]. Estos receptores reconocen productos microbianos, como lipopolisacárido (LPS) o DNA bacteriano con secuencias CpG, los cuales pudieron estar contaminando cualquiera de las preparaciones utilizadas durante el aislamiento y purificación de los linfocitos.

2. Otras fuentes de CD154 podrían haber activado la función presentadora de antígenos del linfocito B. Como se mencionó en la introducción, tipos celulares diferentes al linfocito T CD4⁺ activado son capaces de expresar CD154. Aunque esta expresión debe participar en la activación de células que expresan CD40 en la periferia, se considera que su importancia en la activación de los linfocitos B en los órganos linfoides durante el desarrollo de una respuesta inmune es mínima, ya que carece de la regulación específica para el antígeno que proporciona el TCR en los linfocitos T CD4⁺. A pesar de estas consideraciones, no se podía descartar que otra fuente de CD154 haya sido la responsable de la activación de los linfocitos B en nuestro modelo experimental.

3. Después de encontrar al antígeno e iniciar su proceso de activación, el linfocito B podría ser capaz de interactuar con el linfocito T CD4⁺ e inducir la expresión de CD154, la cual proporcionaría la segunda señal para completar la activación de la función presentadora de antígenos del linfocito B.

La estrategia que se utilizó para probar estas hipótesis fue transferir linfocitos T CD4⁺ 3A9 deficientes de CD154 junto con los linfocitos B MD4, ó linfocitos B MD4 deficientes de CD40 junto con linfocitos T CD4⁺ 3A9. En estos

experimentos no se observó activación de los linfocitos T CD4⁺ ni de los linfocitos B (Fig. 14 y 15), lo cual indica que para que se active la función presentadora de antígenos del linfocito B se requiere de una vía CD154-CD40 intacta. De esta manera se descartó que la activación del linfocito B en este sistema dependa de señales derivadas de un receptor distinto a CD40 y que exista una fuente de CD154 distinta al linfocito T CD4⁺ activado. Así, la expresión de CD154 en el linfocito T CD4⁺ necesaria para la activación del linfocito B debe ser desencadenada por su interacción con el linfocito B.

Aunque en este estudio no se detectó la expresión de CD154 en los linfocitos T CD4⁺ a los tiempos probados, probablemente debido a que es transitoria [32], muchos datos publicados en la literatura apoyan la hipótesis de que la interacción linfocito B-linfocito T CD4⁺ después del encuentro con el antígeno puede culminar en la activación de las dos células. Como se describió en la introducción, la expresión de CD86 y de CD154 en los linfocitos B y T CD4⁺, respectivamente, se inician con el entrecruzamiento de los receptores para antígeno de estas células [24,29]. Sin embargo, en ambos casos es indispensable la presencia de moléculas co-estimuladoras para que se complete la activación [29-31,38,39], y la expresión de éstas podría aumentar progresivamente hasta llegar a niveles adecuados para la activación. De esta manera, el linfocito B después de encontrar al antígeno puede presentar el complejo péptido-MHCII en su superficie y expresar niveles bajos de CD86 (Fig. 16A). Estos dos elementos pueden estimular, a través del TCR y CD28, respectivamente, la expresión de CD154, la cual estimularía en el linfocito B la expresión de CD80 y CD86 [37] (Fig. 16B), haciendo que las señales intercambiadas crezcan progresivamente y culminen en la activación de las dos células (Fig. 16C y D). Varias publicaciones han sugerido anteriormente esta sucesión de eventos [6,29,85], y nuestro modelo proporciona una prueba de que pueden ocurrir en ausencia de otros tipos de CPA profesionales.

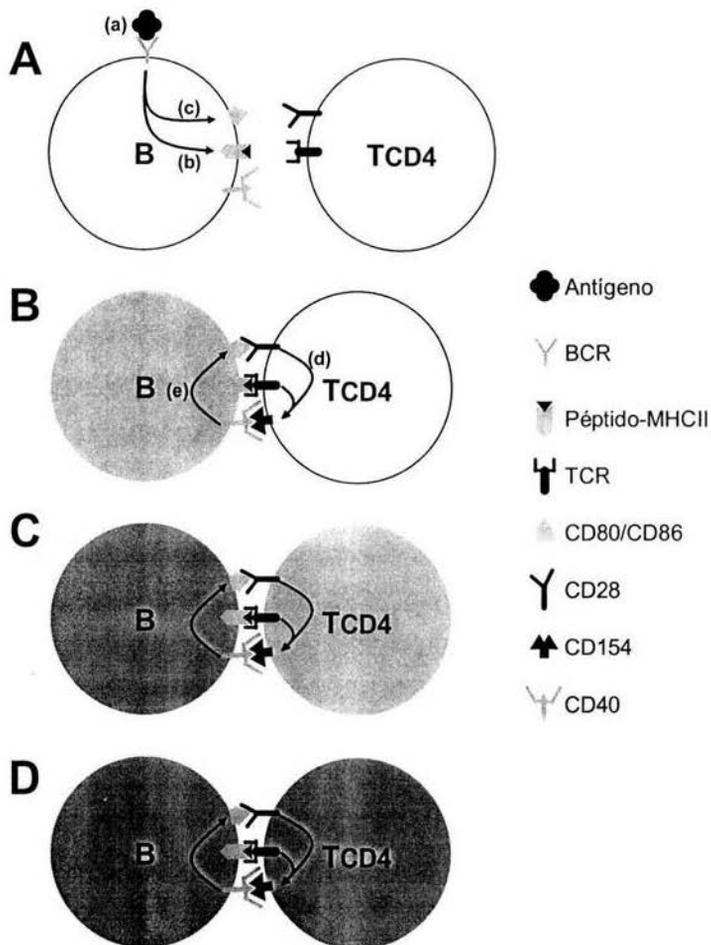


Figura 16. Activación de los linfocitos T CD4⁺ por linfocitos B en ausencia de otros tipos de CPA. (A) El entrecruzamiento del BCR por su antígeno específico (a) conduce a la expresión del complejo péptido-MHCII (b) y de CD86 en niveles bajos (c). **(B)** El TCR de un linfocito T CD4⁺ específico para el mismo antígeno es entrecruzado por el complejo péptido-MHCII, mientras que CD86 se une al receptor CD28. Estas dos señales inducen la expresión de CD154 en niveles bajos (d). Esta molécula se une a CD40, iniciando señales que conducen a aumento de expresión de CD86 e inducen la expresión de CD80 (e). **(C)** y **(D)** Las señales se siguen intercambiando entre las dos células hasta que se completa la activación de las dos.

El modelo experimental utilizado presenta características que no reflejan una respuesta inmune normal. Como ya se discutió, el uso de linfocitos transgénicos, indispensable para obtener una interacción linfocito B - linfocito T CD4⁺ productiva, representa una etapa avanzada de la respuesta inmune en la que la expansión clonal ya se llevó a cabo. Adicionalmente, se utilizó sólo un antígeno modelo. A pesar de estas limitaciones, los resultados son relevantes ya que pueden aplicarse a las situaciones en las que el linfocito B participa como CPA. En primer lugar, en las enfermedades autoinmunes el proceso patológico se desarrolla en el curso de años, en los que pueden expandirse las clonas relevantes de linfocitos B [50,86], y además existe una inmensa cantidad de potenciales antígenos blanco. Por otro lado, las aplicaciones en vacunas constituyen respuestas inmunes artificiales en las que se puede manipular de varias formas a las células y los antígenos participantes. Así, este trabajo contribuye al mejor entendimiento de estos procesos al establecer la capacidad del linfocito B como CPA y la importancia de su activación a través de CD40.

En conclusión, el sistema experimental utilizado permitió determinar que interacciones entre linfocitos B y T CD4⁺ que nunca habían estado en contacto con el antígeno resultaron en activación de ambas células y, en el contexto del conocimiento actual sobre el tema, estas observaciones originales contribuyen a reforzar la importancia del papel de la función presentadora de antígenos del linfocito B.

REFERENCIAS

1. Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A. y Pape, K. A. **In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells.** *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19: 23-45.
2. Frauwirth, K. A. y Thompson, C. B. **Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation.** *J. Clin. Invest.* 2002, 109: 295-299.
3. Cassell, D. J. y Schwartz, R. H. **A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation.** *J. Exp. Med.* 1994, 180: 1829-1840.
4. Morris, S. C., Lees, A. y Finkelman, F. D. **In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells.** *J. Immunol.* 1994, 152: 3777-3785.
5. Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. y Bottomly, K. **B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4 T cells to protein antigens in vivo.** *J. Immunol.* 1995, 155: 3734-3741.
6. Constant, S. **B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4 T cell priming in vivo.** *J. Immunol.* 1999, 162: 5695-5703.
7. Itano, A. A. y Jenkins, M. K. **Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node.** *Nat. Immunol.* 2003, 4: 733-739.
8. Ninio, J. y Amigorena, S. **How B cells and dendritic cells may cooperate in antigen purification.** *J. Theor. Biol.* 2004, 231: 309-317.
9. Cyster, J. G. **Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.** *Science* 1999, 286: 2098-2102.
10. Crivellato, E., Vacca, A. y Ribatti, D. **Setting the stage: an anatomist's view of the immune system.** *Trends Immunol.* 2004, 25: 210-217.
11. Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. y Jenkins, M. K. **Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.** *Science.* 1998, 281: 96-99.
12. Liu, Y.-J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y.-T. y MacLennan, I.C. **Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens.** *Eur. J. Immunol.* 1991, 21: 2951-2962.
13. Okada, T., Miller, M. J., Parker, I., Krummel, M. F., Neighbors, M., Hartley, S. B., O'Garra, A., Cahalan, M. D. y Cyster, J. G. **Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells.** *PLoS Biol.* 2005, 3: e150.
14. Batista, F. D. y Neuberger, M. S. **Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate.** *Immunity* 1998, 8: 751-759.
15. Germain, R. **MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation.** *Cell* 1994, 76: 287-299.

16. Wolf, P. R. y Ploegh, H. L. **How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway.** *Annu. Rev. Dev. Cell Biol.* 1995, 11: 267-306.
17. Aluvihare, V. R., Khamlichi, A. A., Williams, G. T., Adorini, L. y Neuberger, M. S. **Acceleration of intracellular targeting of antigen by the B-cell antigen receptor: importance depends on the nature of the antigen-antibody interaction.** *EMBO J.* 1997, 16: 3553-3562.
18. Clark, M. R., Massenbunrg, D., Siemasko, K., Hou, P. y Zhang, M. **B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway.** *Curr. Op. Immunol.* 2004, 16: 382-387.
19. Niiro, H., Allam, A., Stoddart, A., Brodsky, F. M., Marshall, A. J. y Clark, E. A. **The B lymphocyte adaptor molecule of 32 kilodaltons (Bam32) regulates B cell antigen receptor internalization.** *J. Immunol.* 2004, 173: 5601-5609.
20. Boes, M., Cuvillier, A. y Ploegh, H. **Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells.** *Trends Cell Biol.* 2004, 14: 175-183.
21. Alfonso, C., Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C. D., Peterson, P. A., Fung-Leung W. P. y Karlsson, L. **The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation.** *Immunol. Rev.* 1999, 172: 255-266.
22. van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tijin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D. y Neefjes, J. **Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO.** *J. Exp. Med.* 2000, 190: 1127-1136.
23. Baumgarth, N. **A two-phase model of B-cell activation.** *Immunol. Rev.* 2000, 176: 171-180.
24. Lenschow, D. J., Sperling, A. I., Cooke, M. P., Freeman, G., Rhee, L., Decker, D. C., Gray, G., Nadler, L. M., Goodnow, C. C. y Bluestone, J. A. **Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen.** *J. Immunol.* 1994, 153: 1990-1997.
25. Nashar, T. O. y Drake, J. R. **The pathway of antigen uptake and processing dictates MHC class II-mediated B cell survival and activation.** *J. Immunol.* 2005, 174: 1306-1316.
26. Laman, J. D., Claassen, E. y Noelle, R. J. **Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L).** *Crit. Rev. Immunol.* 1996, 16: 59-108.
27. Grewal, I. S., y Flavell, R. A. **CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.** *Annu. Rev. Immunol.* 1998, 16: 111-135.
28. Mackey, M. F., Barth, R. J. y Noelle, R. J. **The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells.** *J. Leukoc. Biol.* 1998, 63: 418-428.
29. Lindgren, H., Axcróna, K. y Leanderson, T. **Regulation of transcriptional activity of the murine CD40 ligand promoter in response to signals through TCR and the costimulatory molecules CD28 and CD2.** *J. Immunol.* 2001, 166: 4578-4585.
30. Parra, E., Mustelin, T., Dohlsten, M. y Mercola, D. **Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter.** *J. Immunol.* 2001, 166: 2437-2443.

31. Schubert, L. A., Cron, R. Q., Cleary, A. M., Brunner, M., Song, A., Lu, L.-S., Julien, P., Krensky, A. M. y Lewis, D. B. **A T cell-specific enhancer of the human CD40 ligand gene.** *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 7386-7395.
32. Hamilton, B. J., Genin, A., Cron, R. Q. y Rigby, W. F. C. **Delineation of a novel pathway that regulates CD154 (CD40 ligand) expression.** *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23: 510-525.
33. Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind E. F. y Noelle R. J. **CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity.** *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22: 307-328.
34. Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. y Saeland, S. **The CD40 antigen and its ligand.** *Annu. Rev. Immunol.* 1994, 12: 881-922.
35. Gordon, J. y Pound, J. D. **Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues.** *Immunology* 2000, 100: 269-280.
36. Faassen, A. E., Dalke, D. P., Berton, M. T., Warren, W. D. y Pierce, S. K. **CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing.** *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 3249-3255.
37. Ranheim, E. A. y Kipps, T. J. **Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal.** *J. Exp. Med.* 1993, 177: 925-935.
38. Roy, M., Aruffo, A., Ledbetter, J., Linsley, P., Kehry, M. y Noelle, R. **Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses.** *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 596-603.
39. Evans, D. E., Munks, M. W., Purkerson, J. M. y Parker, D. C. **Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40.** *J. Immunol.* 2000, 164: 688-697.
40. Clatza, A., Bonifaz, L. C., Vignali, D. A. y Moreno, J. **CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation.** *J. Immunol.* 2003, 171: 6478-6487.
41. Buhlmann, J. E., Foy, T. M., Aruffo, A., Crassi, K. M., Ledbetter, J. A., Green, W. R., Xu, J. C., Shultz, L. D., Roopesian, D., Flavell, R. A., Fast, L., Noelle, R. J. y Durie, F. H. **In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic.** *Immunity* 1995, 2: 645-653.
42. Hollander, G. A., Castigli, E., Kulbacki, R., Su, M., Burakoff, S. J., Gutierrez-Ramos, J. C. y Geha, R. S. **Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 4994-5003.
43. Ozaki, M. E., Coren, B. A., Huynh, T. N., Redondo, D. J., Kikutani, H. y Webb, S. R. **CD4 T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs.** *J. Immunol.* 1999, 163: 5250-5256.
44. Lee, B. O., Moyron-Quiroz, J., Rangel-Moreno, J., Kusser, K. L., Hartson, L., Sprague, F., Luna, F. E. y Randall, T. D. **CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary B cell responses.** *J. Immunol.* 2003, 171: 5707-5717.
45. Enyon, E. E., y Parker, D. C. **Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens.** *J. Exp. Med.* 1992, 175: 131-138.
46. Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C. y Davis, M. M. **Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells.** *J. Exp. Med.* 1994, 179: 1539-1549.

47. Croft, M., Joseph, S. B. y Miner, K. T. **Partial activation of naive CD4 T cells and tolerance induction in response to peptide presented by resting B cells.** *J. Immunol.* 1997,159: 3257-3265.
48. Yuschenkoff, V. N., Sethna, M. P., Freeman, G. J. y Parker, D. C. **Coexpression of B7-1 and antigen blocks tolerance induction to antigen presented by resting B cells.** *J. Immunol.* 1996, 157: 1987-1995.
49. Lin, R.-H., Mamula, M. J., Hardin, J. A. y Janeway, Jr., C. A. **Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells.** *J. Exp. Med.* 1991, 173: 1433-1439.
50. Liang B. y Mamula, M. J. **Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, 57: 561-568.
51. Chan, O.T., Hannum, L., Haberman, A., Madaio, M. P. y Shlomchick, M. J. **A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus.** *J. Exp. Med.* 1999, 189: 1639-1648.
52. Yan, J. y Mamula, M. J. **B and T cell tolerance and autoimmunity in autoantibody transgenic mice.** *Int. Immunol.* 2002, 14: 963-971.
53. Takemura, S., Klimiuk, P. A., Braun, A., Goronzy, J. y Weyand, C. M. **T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent.** *J. Immunol.* 2001, 167: 4710-4718.
54. O'Neill, S. K., Shlomchik, M. J., Glant, T. T., Cao, Y., Doodes, P. D. y Finnegan, A. **Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis.** *J. Immunol.* 2005, 174 : 3781-3788.
55. Falcone, M., Lee, J., Patstone, G., Yeung, B. y Sarvetnick, N. **B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice.** *J. Immunol.* 1998, 161: 1163-1168.
56. Serreze, D. V., Fleming, S. A., Chapman, H. D., Richard, S. D., Leiter, E. H. y Tisch, R. M. **B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.** *J. Immunol.* 1998, 161: 3912-3918.
57. Noorchashm, H., Lieu, Y. K., Noorchashm, N., Rostami, S. Y., Greeley, S. A., Schlachterman, A., Song, H. K., Noto, L. E., Jevnikar, A. M., Barker, C. F. y Naji, A. **I α g7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice.** *J. Immunol.* 1999, 163: 743-750.
58. Wong, F. S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L. G., Janeway, Jr., C. A. y Shlomchick, M. J. **Investigation of the role of B cells in type 1 diabetes in the NOD mouse.** *Diabetes.* 2004, 53: 2581-2587.
59. Schultze J. L., Grabbe, S. y von Bergwelt-Baildon, M. S. **DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy.** *Trends Immunol.* 2004, 25: 659-664.
60. von Bergwelt-Baildon, M. S., Vonderheide, R. H., Maecker, B., Irano, N., Anderson, K. S., Butler, M. O., Xia, Z., Zeng, W. Y., Wuherpfennig, K. W., Nadler, L. M. y Schultze, J. L. **Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40 activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application.** *Blood* 2002. 99: 3319-3325.

61. Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. y Hwu, P. **CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells.** *Cancer Res.* 2003, 63: 2836-2843.
62. Van den Bosch, G. A., Ponsaerts, P., Nijs, G., Lenjou, M., Vanham, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. y Van Tendeloo, V. F. I. **Ex vivo induction of viral antigen-specific CD8⁺ T cell responses using mRNA-electroporated CD40-activated B cells.** *Clin. Exp. Immunol.* 2005, 139: 458-467.
63. Sunshine, G. H., Jimmo, B. L., Ianelli, C. y Jarvis, L. **Strong priming of T cells adoptively transferred into scid mice.** *J. Exp. Med.* 1991, 174: 1653-1656.
64. Epstein, M. M., Di Rosa, F., Jankovic, D., Sher, A. y Matzinger, P. **Successful T cell priming in B cell-deficient mice.** *J. Exp. Med.* 1995, 182: 915-922.
65. Gerloni, M., Rizzi, M., Castiglioni, P. y Zanetti, M. **T cell immunity using transgenic B lymphocytes.** *PNAS* 2004, 101: 3892-3897.
66. Liu, Y., Ramarathinam, L., Guo, A., Huszar, D., Trounstein, M. y Zhao, M. **Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 response.** *Int. Immunol.* 1995, 7: 1353-1362.
67. Macaulay, A. E., DeKruyff, R. H. y Umetsu, D. T. **Antigen-primed T cells from B cell-deficient JHD mice fail to provide B cell help.** *J. Immunol.* 1998, 160: 1694-1700.
68. Hon, H., Oran, A., Bocker, T. y Jacob, J. **B lymphocytes participate in cross presentation of antigen following gene gun vaccination.** *J. Immunol.* 2005, 174: 5233-5242.
69. Mason, D. Y., Jones, M. y Goodnow, C. C. **Development and follicular localization of tolerant B lymphocytes in lysozyme/anti-lysozyme IgM/IgD transgenic mice.** *Int. Immunol.* 1992, 4: 163-175.
70. Renshaw, B. R., Fanslow III, W. C., Armitage, R. J., Campbell, K. A., Liggitt, D., Wright, B., Davison, B. L. y Maliszewski, C. R. **Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice.** *J. Exp. Med.* 1994, 180: 1889-1900.
71. Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J. y Flavell, R. A. **Mice deficient for the CD40 ligand.** *Immunity* 1994, 1: 423-431.
72. Castigli, E., Alt, F. W., Davidson, L., Bottaro, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K. y Geha, R. S. **CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 12135-12139.
73. Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. y Hodgkin, P. D. **Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.** *Immunol. Cell Biol.* 1999, 77: 516-522.
74. Takeda, S., Rodewald, H.-R., Arakawa, H., Bluethmann, H. y Shimizu, T. **MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span.** *Immunity* 1996, 5: 217-228.
75. Bocker, T. **Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells.** *J. Exp. Med.* 1997, 186: 1223-1234.

76. Beutner, U., y MacDonald, H. R. **TCR-MHC class II interaction is required for peripheral expansion of CD4 T cells in a T cell deficient host.** *Int. Immunol.* 1998, 10: 305-310.
77. Boursalian, T. E. y Bottomly, K. **Survival of naïve CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu.** *J. Immunol.* 1999, 162: 3795-3801.
78. Kieper, W. C. y Jameson, S. C. **Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96: 13306-13318.
79. Viret, C., Wong, F. S., y Janeway, Jr., C. A. **Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition.** *Immunity* 1999, 10: 559.
80. Bell, E. B., Sparshott, S. M., Drayson, M. T., y Ford, W. L. **The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells.** *J. Immunol.* 1987, 139: 1379-1389.
81. Oehen, S., y Brduscha-Riem, K. **Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies?** *Eur. J. Immunol.* 1999, 29: 608-615.
82. Constant, S., Sant' Angelo, D., Pasqualini, T., Taylor, T., Levin, D., Flavell, R. y Bottomly, K. **Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4⁺ T cells.** *J. Immunol.* 1995b, 154: 4915-4923.
83. Chen, W., Yu, Y., Shao, C., Zhang, M., Wang, W., Zhang, L. y Cao, X. **Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody.** *Immunol. Lett.* 2001, 77: 17-23.
84. Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchick, M. J. y Marshak-Rothstein, A. **Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA.** *Immunity* 2003, 19: 837-847.
85. Grewal, I.S., Foellmer, H.G., Grewal, K.D., Xu, J., Hardardottir, F., Baron, J.L., Janeway Jr., C.A. y Flavell, R.A. **Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis.** *Science* 1996, 273: 1864-1867.
86. Chan, O.T., Madaio, M. P. y Shlomchick, M. J. **The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis.** *Immunol. Rev.* 1999, 169: 107-121.

APÉNDICE I

Abreviaturas

APC	Aloficocianina
BCR	Receptor de células B
CD	Célula(s) dendrítica(s)
CFSE	5(6)-Succinimidil-éster de diacetato de carboxifluoresceína
CPA	Célula(s) presentadora(s) de antígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFN- γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
LES	Lupus eritematoso sistémico
LG	Lisozima de gallina
MHCII	Molécula(s) del complejo principal de histocompatibilidad clase II
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína de peridinin clorofila
p-LG-IA ^k	Complejo péptido de LG ₄₈₋₆₂ -IA ^k
TCR	Receptor de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral

APÉNDICE II

Artículo publicado en el *European Journal of Immunology*

Rodríguez-Pinto, D. y Moreno, J. **B cells can prime naive CD4⁺ T cells *in vivo* in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner.** *Eur. J. Immunol.* 2005, 35: 1097-1105.



B cells can prime naive CD4⁺ T cells *in vivo* in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner

Daniel Rodríguez-Pinto and José Moreno

Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México

The role of B cells as APC is well established. However, their ability to prime naive T cells *in vivo* has been difficult to examine because of the presence of dendritic cells. The current studies were undertaken to examine this issue in a model of adoptive transfer of antigen-specific B cells and T cells into histoincompatible Rag2^{-/-} mice. By means of this system, we were able to demonstrate that antigen-specific B cells are competent APC for naive CD4⁺ T cells specific for the same antigen. *In vivo* antigen presentation resulted in expansion of both CD4⁺ T cells and B cells. The antigen-presenting function of the transferred B cells was dependent on the CD154-CD40 interaction, as transfer of CD154-deficient antigen-specific CD4⁺ T cells or CD40-deficient B cells failed to induce T and B cell expansion in response to immunization. These results indicate that antigen-specific B cells have the capacity to induce primary T cell responses in the absence of other competent APC.

Received 7/10/04

Revised 27/1/05

Accepted 7/2/05

[DOI 10.1002/eji.200425732]

Key words:

Antigen-presenting

cells · CD154 · CD40

· B cells · CD4⁺ T cells

Introduction

The role of B cells as APC in primary immune responses has not been considered of importance because of their dependence on help from activated CD4⁺ T cells to become competent APC [1]. This constraint implies that other types of professional APC are the only ones capable of priming naive CD4⁺ T cells. Accordingly, B cell deficiency is not an impediment for CD4⁺ T cell priming in some experimental models [2, 3]. However, B cells have the ability to prime naive CD4⁺ T cells both *in vitro* [4, 5] and *in vivo* [6–9], and immune responses to certain antigens are hampered in the absence of B cells [5, 10, 11]. Yet, formal evidence that B cells can

prime an immune response without the need of other professional APC is lacking.

B cells possess a high-affinity antigen receptor, the BCR, that permits efficient presentation of a particular antigen to specific CD4⁺ T cells [12]. However, to activate CD4⁺ T cells, B cells need to mature into professional APC, a process in which help from activated CD4⁺ T cells, by means of the CD154 molecule, is essential. B cell activation requires two major signals, the first one generated by BCR cross-linking by antigen and the other by the interaction of CD154 with the B cell surface receptor CD40 [13]. Signals derived from CD40 ligation drive B cell growth, proliferation and survival and lead to up-regulation and redistribution of MHC class II molecules (MHCII) and costimulatory molecules such as CD80 and CD86 [8, 14–17]. These effects are crucial for B cell maturation, as B cell antigen-presenting function is impaired in both CD40- and CD154-deficient mice as well as after blockade of CD154-CD40 interactions [14, 18–20]. Consequently, B cells need to interact with CD154-expressing CD4⁺ T cells to become competent APC.

Correspondence: José Moreno, Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Apartado Postal A-047, Coahuila No. 5, Col. Roma, Código Postal 06703, México D.F., Mexico

Fax: +52-55-57610952

e-mail: jmorenor@cis.gob.mx

Abbreviations: MHCII: MHC class II molecules · HEL: Hen egg lysozyme · HELp-IA^k: HEL peptide_{48–62}-IA^k complex

The need of a molecule expressed only by activated CD4⁺ T cells to develop the antigen-presenting function of B cells indicates that B cells cannot prime an immune response by themselves unless they are able to elicit CD154 expression by CD4⁺ T cells during their own activation process. Only a few studies have attempted to demonstrate that B cells can prime naive CD4⁺ T cells on their own, without the participation of other professional APC *in vivo*. Strategies to show this have included targeting antigen to B cells through specific receptors [6], i.v. injection of antigen without adjuvant into BCR-transgenic mice [7] and preloading B cells with peptide *ex vivo* [8]. All these studies resulted in CD4⁺ T cell activation, leading to the conclusion that it was due to antigen presentation by B cells without the involvement of other APC. However, because of the presence of other histocompatible APC capable of generating the peptide-MHCII complex needed for CD4⁺ T cell activation, the possibility that those other APC gained access to the antigen and were responsible for the initial activation of naive CD4⁺ T cells could not be formally ruled out. Recently, Gerloni et al. showed that transferred B cells can prime naive CD4⁺ T cells *in vivo* in DC-deficient mice. However, in their study, the antigen presented by B cells was a transgene-encoded endogenous protein that gained access to the MHCII presentation pathway. Furthermore, naive B cells were activated during the transgenesis process, and thus the normal pathways of B cell activation were not taken into consideration [9].

To test whether B cells presenting an exogenous antigen can prime naive CD4⁺ T cells *in vivo* by themselves, we developed a system in which B cells were the only APC capable of generating the specific peptide-MHCII complex needed to activate CD4⁺ T cells. Moreover, we used CD154- and CD40-deficient mice to assess the participation of CD154 expressed by CD4⁺ T cells in the maturation of B cells into competent APC in this system. This experimental design allowed us to demonstrate that B cells can prime naive CD4⁺ T cells in the absence of other APC and that their maturation depends on CD154 expression by CD4⁺ T cells.

Results

Naive CD4⁺ T cells proliferate in response to antigen presented by B cells *in vivo*

To test the capacity of B cells to induce naive CD4⁺ T cell proliferation *in vivo*, we transferred purified spleen B cells from transgenic mice bearing an anti-hen egg lysozyme (HEL) BCR and CD4⁺ T cells from transgenic mice expressing a TCR specific for HEL peptide_{48–62}-IA^k complex (HELp-IA^k) into lymphocyte-deficient Rag2^{-/-} recipients. In some experiments, anti-HELp-IA^k CD4⁺ T

cells were labeled with CFSE prior to transfer. Donor mice were of the H2^k haplotype, while recipient mice were of the H2^b haplotype. In this setting, the transferred B lymphocytes were the only IA^k-expressing cells present in recipient mice after transfer and, therefore, the only APC able to provide the restriction element for the TCR expressed by the transferred CD4⁺ T cells. A group of recipient mice received only the anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells and thus had no IA^k-expressing APC. The mice were immunized with HEL or PBS 24 h after transfer, and after 3 days they were killed, and spleen cells were separated, counted and stained with Ab specific for CD4 and Vβ8, the TCR V segment expressed by the transgenic CD4⁺ T cells. Among the mice that received anti-HEL B cells, the relative and absolute numbers of CD4⁺Vβ8⁺ cells as well as the loss of CFSE fluorescence in CD4⁺Vβ8⁺ cells, which reflects the number of cell divisions, were significantly higher in HEL-immunized mice than in those that received PBS. Mice that did not receive B cells had reduced numbers of CD4⁺Vβ8⁺ cells and retained more CFSE fluorescence in relation to the other groups, despite having been immunized with HEL (Fig. 1A–C).

To identify the transferred B cells, splenocytes were also stained with HEL (to label the anti-HEL BCR), and mAb against CD19 (a B cell marker) and IA^k. The percentage of HEL⁺CD19⁺ splenocytes positive for IA^k ranged from 0 to 0.02% (Fig. 1D), similar to background levels observed in untouched Rag2^{-/-} mice of the H2^b haplotype (data not shown). Conversely, more than 98% of HEL⁺CD19⁺ cells expressed high levels of IA^k (Fig. 1D). Thus, as the transferred B cells were the only IA^k-expressing APC in recipient mice, these data indicate that B cells, after internalizing antigen and generating the peptide-MHCII complex, are capable of inducing proliferation of naive CD4⁺ T cells in the absence of other histocompatible professional APC. The higher proliferation of CD4⁺Vβ8⁺ cells in mice that received anti-HEL B cells and PBS in relation to mice that received no B cells indicates that the transferred B cells induced some degree of antigen-independent "homeostatic" proliferation.

After antigen presentation by B cells *in vivo*, CD4⁺ T cells up-regulate CD69 and synthesize cytokines *in vitro*

To examine the activation status of CD4⁺ T cells after antigen presentation by B cells, we transferred either anti-HEL B cells plus anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells or the CD4⁺ T cells alone into Rag2^{-/-}/H2^b mice, which were immunized with HEL 24 h later. After 3 days, we collected spleen cells and measured the expression of CD69 and CD62L and the production of IFN-γ and IL-2 by CD4⁺ T cells *in vitro*. CD69 is an early activation

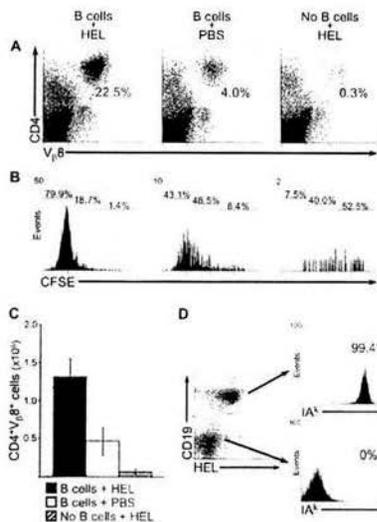


Fig. 1. Naive CD4⁺ T cells proliferate in response to antigen presented by B cells *in vivo*. Anti-HEL B cells and CFSE-labeled anti-HELp-IA⁺ CD4⁺ T cells, both of the H2^b haplotype, or the CD4⁺ T cells alone were adoptively transferred into Rag2^{-/-} mice of the H2^b haplotype. Mice were immunized with HEL or PBS 24 h later, and 3 days later spleen cells were isolated, counted and stained with anti-CD4 and anti-Vβ8 or HEL, anti-CD19 and anti-IA⁺. For mice that received either B cells + CD4⁺ T cells + HEL (left), B cells + CD4⁺ T cells + PBS (center) or CD4⁺ T cells + HEL (right), the percentage (A) and total number (C) of CD4⁺Vβ8⁺ splenocytes as well as CFSE fluorescence in the CD4⁺Vβ8⁺ gate (B) are shown. (D) Percentages of IA⁺ splenocytes among HEL⁺CD19⁺ and HEL⁺CD19⁻ cells are shown, as gated on the dot plot shown to the left. Means and standard deviations of six mice per group from four separate experiments are shown in (C). One representative mouse per group is shown in (A), (B) and (D).

marker, and CD62L is a molecule that is expressed by naive CD4⁺ T cells while being down-regulated in memory CD4⁺ T cells. After purification prior to transfer, CD4⁺Vβ8⁺ cells were CD69⁺CD62L⁺ (Fig. 2A, left panel). CD69 expression was significantly higher in CD4⁺Vβ8⁺ cells recovered from mice that had received anti-HEL B cells as shown by both the percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (Fig. 2A, C). No differences in the expression of CD62L were observed (Fig. 2A). The production of IFN-γ and IL-2 by CD4⁺ T cells was evaluated *in vitro* after re-exposure to antigen presented by cells from an anti-HEL B cell line expressing IA⁺ (Fig. 2B, C). Only CD4⁺Vβ8⁺ cells that had contact with histocompatible B cells *in vivo* were able to produce significant amounts of IFN-γ and

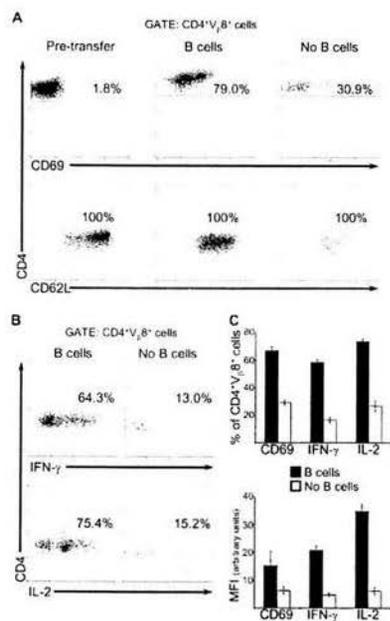


Fig. 2. CD4⁺ T cells have an activated phenotype after antigen presentation by B cells *in vivo*. Anti-HEL B cells and anti-HELp-IA⁺ CD4⁺ T cells, both of the H2^b haplotype, or the CD4⁺ T cells alone were transferred into Rag2^{-/-} mice. After 24 h the mice were immunized with HEL. Spleen cells were isolated 3 days later, counted and stained with anti-CD4, anti-Vβ8 and anti-CD69 or anti-CD62L. Alternatively, the splenocytes were incubated at 37°C in the presence of brefeldin A with LK-DO1.3 cells pre-incubated with HEL; after 4 h, the cells were stained extracellularly with anti-CD4 and anti-Vβ8 and intracellularly with anti-IFN-γ and anti-IL-2. (A) Percentage of CD69- and CD62L-positive cells within the CD4⁺Vβ8⁺ gate prior to transfer (left) and in mice that received anti-HEL B cells (center) or no B cells (right). (B) Percentage of cells positive for IFN-γ and IL-2 in the CD4⁺Vβ8⁺ gate. (C) Percentage of CD4⁺Vβ8⁺ cells positive for CD69, IFN-γ and IL-2 (top) and mean fluorescence intensity (MFI) for each of these markers in the whole CD4⁺Vβ8⁺ population (bottom). Means and standard deviations of four mice per group from two independent experiments are shown in (C). One representative mouse per group is shown in (A) and (B).

IL-2 *in vitro*; CD4⁺Vβ8⁺ cells that had no contact with B cells *in vivo* produced negligible levels of both cytokines despite being in contact with histocompatible APC loaded with the relevant peptide-MHCII complex *in vitro*. Splenocytes incubated with APC that had not been loaded with antigen did not produce significant amounts of either cytokine (data not shown). These results indicate that the proliferation of CD4⁺ T cells observed

after antigen presentation by B cells was associated with an activated phenotype.

In the presence of relevant antigen, B cells proliferate and up-regulate MHCII and costimulatory molecules

Our next goal was to examine whether the capacity of B cells that induced antigen-dependent proliferation of naive CD4⁺ T cells in the experiments described above was related to their expansion and up-regulation of molecules that participate in antigen presentation and CD4⁺ T cell activation. For this purpose, mice transferred with anti-HEL B cells and anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells received an injection of HEL or PBS. Splenocytes were isolated 3 days later and stained with mAb specific for CD80 and CD86 (ligands for the T cell costimulatory receptor CD28) in addition to the aforementioned markers anti-HEL BCR, CD19 and IA^k. The absolute and relative numbers of HEL⁺CD19⁺ cells in mice that received HEL were significantly higher than in controls (Fig. 3A, B). The size of CD19⁺ cells and their expression of IA^k, CD80 and CD86 were also increased in mice immunized with HEL in relation to controls (Fig. 3C). These results indicate that the presence of antigen is not only essential for generation of the peptide-MHCII complex but also drives maturation of the B cell into a professional APC.

Expression of antigen-specific BCR and MHCII by B cells is responsible for CD4⁺ T cell antigen-specific and homeostatic proliferation, respectively

To further examine the role of the antigen-specific BCR and MHCII in CD4⁺ T cell proliferation induced by B cells, we carried out similar transfer experiments including additional groups of mice that received B cells from wild-type mice of the H2^k (B10.BR) or H2^b (B6) haplotypes. When wild-type IA^k-expressing B cells were the APC in the system, CD4⁺ T cell proliferation did not reach the levels observed when transgenic anti-HEL B cells were transferred. However, the numbers of CD4⁺VP8⁺ cells recovered from these mice were significantly higher than those found in mice that received wild-type IA^b-expressing B cells, in which very low numbers of CD4⁺ T cells survived (Fig. 4A, B). Accordingly, wild-type B cells of either haplotype did not show extensive proliferation or up-regulation of MHCII, CD80 or CD86 (data not shown). These data point toward a requirement for high numbers of antigen-specific B cells for effective priming of naive CD4⁺ T cells. They also support a role for MHCII expressed by B cells in the homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells observed in this system.

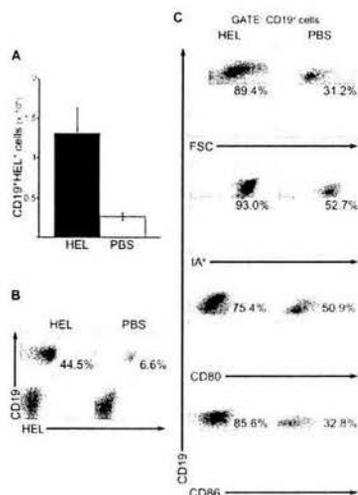


Fig. 3. Internalization of antigen through the BCR by B cells transferred together with antigen-specific CD4⁺ T cells results in their expansion and maturation into professional APC. Anti-HEL B cells and anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells were transferred into Rag2^{-/-} mice, followed by immunization with HEL (left) or PBS (right) 24 h later. Splenocytes were isolated 3 days later, counted and stained with anti-CD19 and either HEL, anti-IA^k, anti-CD80 or anti-CD86. The total number (A) and percentage (B) of HEL⁺CD19⁺ splenocytes as well as forward scatter (FSC) and the percentage of cells positive for IA^k, CD80 and CD86 in the CD19⁺ gate (C) are shown. Means and standard deviations of six mice per group from three independent experiments are shown in (B). One representative mouse per group is shown in (A) and (C).

B cells can induce CD4⁺ T cell proliferation in non-lymphopenic mice

We next examined the extent to which the lymphopenic environment in recipient mice contributed to the CD4⁺ T cell proliferation observed in this system. For this purpose, we used histocompatible mice as recipients, because allogeneic mice with a normal lymphocyte repertoire would reject the transferred cells. However, to isolate the contribution of B cells in CD4⁺ T cell proliferation from that of other APC, we first used histocompatible lymphocyte-deficient mice as recipients. Transfer of anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells alone into Rag2^{-/-}/H2^k mice resulted in proliferation of the transferred cells after immunization with HEL as compared to the low-level homeostatic proliferation seen in mice that received anti-HEL B cells and PBS (Fig. 5A) and the proliferation seen in Rag2^{-/-}/H2^b mice

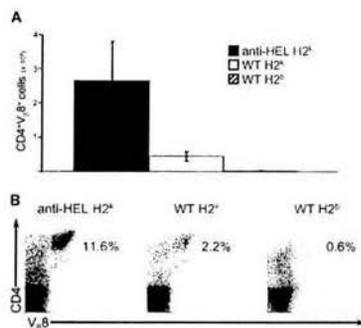


Fig. 4. Antigen-specific B cells induce high levels of CD4⁺ T cell proliferation, whereas wild-type histocompatible B cells induce a low degree of homeostatic proliferation. B cells from anti-HEL BCR-transgenic mice (left) or wild-type mice of H2^k (center) or H2^b (right) haplotypes were adoptively transferred into Rag2^{-/-} mice together with anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells. The mice were immunized with HEL 24 h later. Spleen cells were isolated 3 days later, counted and stained with anti-CD4 and anti-Vβ8. The total number (A) and percentage (B) of CD4⁺Vβ8⁺ splenocytes are shown. Means and standard deviations of four mice per group from two independent experiments are shown in (A). One representative mouse per group is shown in (B).

transferred with CD4⁺ T cells only (compare Fig. 5A with Fig. 1C). This degree of proliferation reflects the capacity of APC other than B cells to present this antigen. However, when mice that had received anti-HEL B cells and anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells were immunized with HEL, CD4⁺ T cell proliferation was much more pronounced (Fig. 5A). This observation indicates that the expanded population of anti-HEL B cells is the main contributor to the presentation of HEL in this system, even in the presence of other IA^k-expressing APC.

After showing that B cells induce CD4⁺ T cell proliferation in lymphocyte-deficient histocompatible mice, we conducted transfer experiments with H2^k recipients that had a full lymphocyte compartment. Splenocytes from anti-HELp-IA^k TCR-transgenic mice were transferred into anti-HEL BCR-transgenic mice or wild-type mice. Significant proliferation was observed only in anti-HEL mice that received HEL, while no differences in CD4⁺Vβ8⁺ cell numbers were seen in anti-HEL mice or wild-type mice that received PBS (reflecting homeostatic proliferation) or wild-type mice that received HEL (reflecting proliferation induced by APC other than B cells) as compared to untouched mice (Fig. 5B). These data indicate that antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation induced by B cells can also take place in mice with a complete lymphocyte compartment, but

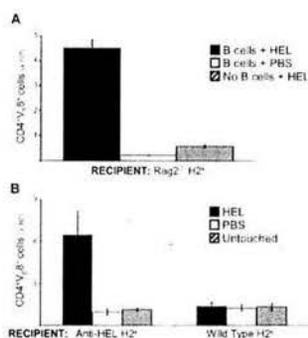


Fig. 5. Anti-HEL B cells induce anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cell proliferation in lymphopenic and non-lymphopenic histocompatible mice. (A) Anti-HEL B cells and anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells or the CD4⁺ T cells alone were adoptively transferred into Rag2^{-/-} mice of the H2^k haplotype. The mice were immunized with HEL or PBS 24 h later. After 3 days, spleen cells were isolated, counted and stained with anti-CD4 and anti-Vβ8. The total number of CD4⁺Vβ8⁺ cells is shown. (B) Splenocytes (10⁷ cells) from anti-HELp-IA^k TCR-transgenic mice were adoptively transferred into anti-HEL BCR-transgenic mice (left) or wild-type mice (right) of the H2^k haplotype, followed by immunization with HEL (filled columns) or PBS (empty columns) 24 h later. After 3 days, spleen cells were isolated, counted and stained with anti-CD4 and anti-Vβ8. The total number of CD4⁺Vβ8⁺ cells for each group as well as for untouched mice (striped columns) is shown. Means and standard deviations of four mice per group from two independent experiments are shown.

antigen-independent homeostatic proliferation is not observed in this setting.

B cell maturation into competent APC is dependent on the expression of CD154 by CD4⁺ T cells

CD154-CD40 interactions are necessary for B cells to become professional APC [18–20]. As CD154 is transiently expressed by CD4⁺ T cells only after activation [15], we examined whether, in order to become competent APC, the B cells that induced CD4⁺ T cell proliferation required the signal derived from CD154 expressed by the transferred CD4⁺ T cells. To achieve this, anti-HELp-IA^k TCR-transgenic mice were backcrossed to CD154^{-/-} mice. CD154^{+/+} or CD154^{-/-} anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells were transferred together with anti-HEL B cells into Rag2^{-/-}/H2^b recipients. These mice were immunized with HEL 24 h later, and 3 days later spleen cells were recovered and stained for CD4, Vβ8, HEL, CD19, IA^k, CD80 and CD86. In mice that received CD154^{-/-} CD4⁺ T cells, B cells were unable to induce the degree of CD4⁺Vβ8⁺ cell proliferation

observed in mice that received CD154^{+/+} CD4⁺ T cells (Fig. 6A, B). This correlated with reduced proliferation of HEL⁺CD19⁺ cells (Fig. 6C) and an absence of IA^k and CD80 up-regulation (Fig. 6D, upper and center panels). CD86 expression was also observed in B cells that were not in contact with CD154-expressing CD4⁺ T cells, albeit at a lower density than in B cells from mice that received CD154^{+/+} CD4⁺ T cells (Fig. 6D, lower panel). These observations strongly suggest that the transferred CD4⁺ T cells are the source of CD154 and that its expression is essential for the transformation of B cells into competent APC.

CD40-deficient antigen-specific B cells are not able to induce CD4⁺ T cell proliferation

In the former experiments, we showed that CD154^{-/-} CD4⁺ T cells cannot proliferate after antigen presentation by B cells that were not in contact with CD154. To test whether B cells that do not receive the activation signal through CD40 can activate CD154-expressing CD4⁺ T cells, we performed the inverse experiment:

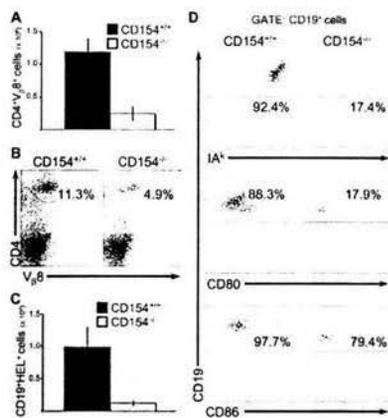


Fig. 6. The signal originating from CD154 expressed in CD4⁺ T cells is required for B cells to become APC capable of inducing CD4⁺ T cell proliferation. CD154^{+/+} (left) or CD154^{-/-} (right) anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells were transferred into Rag2^{-/-} mice of the H2^b haplotype together with anti-HEL B cells. Mice were immunized with HEL 24 h later, and after 3 days spleen cells were harvested, counted and stained for CD4, Vβ8, HEL, CD19, IA^k, CD80 and CD86. The total number (A) and percentage (B) of CD4⁺Vβ8⁺ cells found in the spleens of each group of mice are shown. (C) Total number of HEL⁺CD19⁺ splenocytes. (D) Expression of IA^k, CD80 and CD86 in the CD19⁺ gate. Means and standard deviations of five mice per group from three separate experiments are shown in (B) and (C). One representative mouse per group is shown in (A) and (D).

transfer of CD40^{+/+} or CD40^{-/-} anti-HEL B cells and anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells. The absence of CD40 on B cells consistently resulted in low levels of proliferation of both CD4⁺ T cells (Fig. 7A, B) and B cells (Fig. 7C). Expression of B cell activation markers, including CD86, was lower in CD40^{-/-} B cells compared to CD40^{+/+} B cells (Fig. 7D). These results strengthen the observation that proliferation of CD4⁺ T cells in this system depends on B cell maturation through signals derived from CD40.

Discussion

The current studies examined the role of B cells as primary APC *in vivo*. We found that an expanded population of antigen-specific B cells is able to prime naive CD4⁺ T cells in the presence of an intact CD154-CD40 pathway. Using lymphocyte transfer experiments in which donor and recipient mice were of different haplotypes, we were able to evaluate the function of B cells in the absence of third-party APC capable of presenting the relevant peptide-MHCII complex. In this system, BCR-transgenic B cells that received antigen

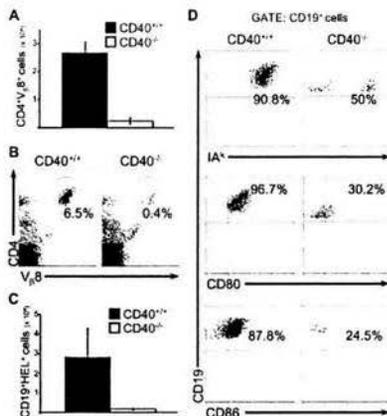


Fig. 7. Expression of the CD40 receptor is required for B cells to mature into competent APC. CD40^{+/+} (left) or CD40^{-/-} (right) anti-HEL B cells were transferred into Rag2^{-/-} mice together with anti-HELp-IA^k CD4⁺ T cells. Mice were immunized with HEL 24 h later, and after 3 days spleen cells were collected, counted and stained for CD4, Vβ8, HEL, CD19, IA^k, CD80 and CD86. Total number (A) and percentage (B) of CD4⁺Vβ8⁺ splenocytes are shown. (C) Total number of HEL⁺CD19⁺ splenocytes. (D) Expression of IA^k, CD80 and CD86 in the CD19⁺ gate. Means and standard deviations of four mice per group from two separate experiments are shown in (B) and (C). One representative mouse per group is shown in (A) and (D).

induced CD4⁺ T cell proliferation, up-regulation of the activation marker CD69 and cytokine expression after further stimulation with antigen *in vitro*. B cells acquired the capacity to prime CD4⁺ T cells after proliferating, growing and up-regulating the expression of MHCII, CD80 and CD86. These results strongly suggest that B cells can become activated and prime CD4⁺ T cells *in vivo* in the absence of other professional APC.

The number of antigen-specific B cells present in the spleen appears to be a critical factor for CD4⁺ T cell priming, as CD4⁺ T cell proliferation was not seen when B10.BR B cells with a normal immune repertoire were transferred. This observation is consistent with an earlier model of CD4⁺ T cell priming by transgenic B cells *in vivo* [7], and it probably reflects highly efficient internalization of antigen by the BCR, which cannot be achieved with the low frequency of B cells specific for a particular antigen present in the normal repertoire. Thus, even though anti-HEL B cells were naive at the moment of transfer, their number represents an expanded population that does not normally exist in a primary immune response. This explains why B cells are not considered APC capable of initiating normal immune responses.

The isolation of B cell antigen-presenting function from other APC in this system required the use of histoincompatible lymphocyte-deficient mice as recipients, because they can tolerate the transfer of allogeneic cells. However, a small degree of antigen-independent homeostatic proliferation, related to the transfer of histocompatible B cells, was also observed in these mice. To further assess the role of lymphopenia in CD4⁺ T cell proliferation, we conducted experiments using lymphopenic and non-lymphopenic histocompatible mice as recipients. We found that in both types of mice, significant CD4⁺ T cell proliferation was only observed when an expanded population of antigen-specific B cells was present. However, in mice with a full lymphocyte compartment, homeostatic proliferation was not seen. These observations reinforce the capacity of B cells to prime naive CD4⁺ T cells *in vivo*.

In the current experiments, B cell proliferation and up-regulation of surface proteins that participate in antigen presentation were only seen in the presence of antigen. Therefore, it is clear that BCR cross-linking provided the first signal for B cell activation. However, B cell maturation into competent APC requires a second signal in the form of the CD154-CD40 interaction [7, 18, 20]. In our system, B cells were able to induce the proliferation of naive CD4⁺ T cells that had not received the signals required to express CD154 from any other APC. This finding raises several possible explanations: (1) CD40-derived signals are not essential for B cells to mature into competent APC and can be replaced by other

signals, (2) CD154 from sources other than CD4⁺ T cells was responsible for the induction of costimulatory activity on B cells or (3) after BCR cross-linking, B cells could express enough costimulatory activity to induce the expression of CD154 on CD4⁺ T cells, which in turn would engage CD40, originating the signals leading to B cell maturation. To explore these possibilities, we carried out transfer experiments using CD154-deficient CD4⁺ T cells. B cell proliferation and up-regulation of MHCII and CD80 were diminished when CD4⁺ T cells lacking CD154 were transferred, and this resulted in a reciprocal absence of CD4⁺ T cell proliferation. Although it has been proposed that CD154 is also capable of signaling, it is unlikely that the defective proliferation of CD154-deficient CD4⁺ T cells could be related to an intrinsic defect of these cells, as CD154-deficient CD4⁺ T cells have no deficiencies in proliferation [21]. Furthermore, we conducted experiments in which CD40-deficient B cells were not able to activate CD154-expressing CD4⁺ T cells, reinforcing the key unidirectional role of the CD154-CD40 pathway. These results indicate that B cell maturation was not due to signals derived from receptors different from CD40 and that it depended on CD154 expression by CD4⁺ T cells. Therefore, B cells elicited the costimulation they need from CD4⁺ T cells on their own. Previous studies of B cell-T cell interaction support this view.

Even though full lymphocyte activation requires more than one type of signal, the initial expression of costimulatory molecules on both CD4⁺ T cells and B cells can occur after TCR and BCR ligation, respectively. TCR cross-linking alone can induce transcription of the CD154 gene and protein expression, while signals derived from the costimulatory receptor CD28 enhance and stabilize this expression [15, 22]. On the B cell side, one of the ligands for CD28, CD86, has been shown to be induced 4–6 h after cross-linking of the BCR by antigen [7, 23, 24]. According to these data, in our system B cells that received antigen should have been able to generate the two major signals needed for the induction of CD154 expression by CD4⁺ T cells: the peptide-MHCII complex that cross-links the TCR and CD86, which binds to CD28. CD154, in turn, provides signals needed to up-regulate surface MHCII and CD80 and to sustain CD86 expression [7, 8, 17]. This crosstalk should lead to an exponential growth of the signals exchanged by T and B cells and culminate in the complete activation of both cells. This sequence of events has been suggested before [7, 15, 22, 25] and can explain our results, despite the fact that we were unable to observe CD154 expression at the time tested, most likely because of its transient nature.

The experimental model presented herein allowed us to conclude that antigen-specific B cell-T cell interactions that take place *in vivo* result in CD4⁺ T cell priming

by B cells. We believe that, taken together with previous studies of B cell antigen-presenting function [7, 9, 26], our results show that B cells have the capacity to contribute significantly to the initiation and amplification of immune responses.

Materials and methods

Reagents and cells

Anti-CD4-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD62L-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-IL-2-PE, anti-CD19-PE, anti-CD40-PE, anti-CD4-allophycocyanin-Cy7, anti-CD43-biotin, anti-B220-biotin, anti-CD11c-biotin, anti-CD11b-biotin, anti-CD8 α -biotin and streptavidin-peridinin chlorophyll protein (PerCP) were purchased from PharMingen (San Diego, CA). The anti-IA^k-producing hybridoma H116.32 and the anti-V β 8-producing hybridoma F23.1 were kindly donated by Günter Hämmerling (DKFZ, Heidelberg, Germany) and Dario Vignali (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN), respectively. The corresponding mAb were purified and biotinylated with NHS-biotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) in our laboratory by standard procedures. The LK-DO1.3 hybridoma was a gift from Michael Neuberger (Oxford University, Oxford, UK). HEL was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), CFSE was from Fluka (Buchs, Switzerland), and brefeldin A was from Roche Biochemicals (Indianapolis, IN). HEL was conjugated to FITC in our laboratory by standard procedures.

Mice

Mice were kept under sterile conditions and cared for in conformity with good laboratory practice guidelines in the animal care facility of the Experimental Medicine Unit of The National Autonomous University of Mexico. B10.BR, B6 and MD4 anti-HEL BCR-transgenic [27] mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). CD40^{-/-}, 3A9 anti-HELp-IA^k TCR-transgenic [28], CD154^{-/-} and Rag2^{-/-} mice were kindly donated by Raif Geha (Harvard University, Boston, MA), Dario Vignali, Leopoldo Flores and Leopoldo Santos (CINVESTAV, Mexico City, Mexico), respectively. MD4, Rag2^{-/-}, CD154^{-/-} and CD40^{-/-} mice were backcrossed to the B10.BR background to obtain mice homozygous for the H2^k haplotype, which were selected by staining peripheral blood leukocytes with anti-IA^k Ab. 3A9 mice were crossed with CD154^{-/-} mice until mice positive for the transgene and homozygous for the gene mutation were obtained, as determined by PCR amplification of the CD154 gene. MD4/CD40^{-/-} mice were obtained by crossing the two types of mice until obtaining transgenic mice homozygous for the CD40 gene mutation, as determined by staining of peripheral blood leukocytes with HEL-FITC and CD40-PE.

Cell purification

Spleen B cells or CD4⁺ T cells from 8- to 15-week-old mice were purified by negative selection using magnetic activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) according to

the manufacturer's instructions. In brief, spleen cells were incubated with saturating concentrations of biotinylated Ab against CD11b, CD11c and CD8 α , along with biotinylated anti-CD43 for B cell isolation or biotinylated anti-B220 and anti-IA^k for CD4⁺ T cell isolation and then with Streptavidin MicroBeads, and passed through an LS MACS cell separation column placed on the magnetic field of a MACS separator. Cells from the negative fraction were collected and used for transfer or CFSE staining. Purity was >95% as determined by staining for B220 and CD4 for B cells and CD4⁺ T cells, respectively.

CFSE staining

Purified CD4⁺ T cells were stained with CFSE as previously described [29]. In brief, cells were suspended in PBS with 0.1% BSA at 10⁷ cells/ml, and CFSE was added to reach a final concentration of 10 mmol/l. After incubating for 10 min at 37°C, cells were washed twice with PBS and resuspended for transfer.

Cell transfer experiments

Mice (6 to 8 weeks old) were injected intravenously with: a) 10⁶ CD4⁺ T cells alone or with 3 \times 10⁶ B cells, or b) 10⁷ whole splenocytes, suspended in 100 μ l of PBS, as indicated for each experiment. Twenty four hours later, mice received an i.p. injection of 100 μ g HEL diluted in 50 μ l PBS or PBS alone, admixed in 50 μ l FIA. Three days later mice were killed, spleen cells were isolated, counted, and used for flow cytometric analysis or cytokine production assays.

Flow cytometry

Spleen cells were stained by standard procedures with the following combinations of reagents: anti-CD4-PE, anti-V β 8-biotin-streptavidin-PerCP, and CD69-FITC; anti-CD4-allophycocyanin-Cy7, anti-V β 8-biotin-streptavidin-PerCP, and CD62L-PE; HEL-FITC, anti-CD19-PE and anti-IA^k-biotin-streptavidin-PerCP; anti-CD80-FITC and anti-CD19-PE; or anti-CD86-FITC and anti-CD19-PE. Flow cytometric analysis was carried out in a FACSCalibur flow cytometry system (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Intracellular cytokine expression assay

Cells of the anti-HEL B lymphoma cell line LKDO1.3 were suspended at a concentration of 5 \times 10⁵ cells/ml in RPMI 1640 medium (Hy-Clone, Salt Lake City, UT) supplemented with 10% FBS and antibiotics. This suspension (500 μ l/well) was placed in 24-well culture plates and incubated overnight with 10 μ g/ml HEL. Spleen cells (5 \times 10⁵) from the transfer experiments were added to each well along with 10 μ g/ml brefeldin A and incubated for 4 h. Cells were collected and stained with anti-CD4-allophycocyanin-Cy7 and anti-V β 8-biotin-streptavidin-PerCP. For intracellular cytokine staining, cells were permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm Solution (PharMingen) according to the manufacturer's instructions and incubated with anti-IFN- γ -PE or anti-IL-2-PE Ab. Cells were then analyzed by flow cytometry.

Acknowledgements: This work was supported by grants No. 42393 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and IMSS-2004/074 from the Fondo para el Fomento de la Investigación. D.R.-P. was supported by a fellowship from Dirección General de Estudios de Postgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of D.R.-P. at UNAM. The authors wish to thank Daniel Andrés Sánchez-Almaraz, Carlos Agustín Salazar-Vargas, Ricardo Vargas-Orozco and Omar López-Cortez for providing expert animal care, and to Drs. Ruy Pérez-Tamayo and Ingeborg Becker for kindly allowing us access to the animal facilities; Erika Paz-Noguez, Gibrán Pérez-Montesinos and Paty Rojo for advice and/or technical assistance; Leopoldo Santos, Héctor Romero-Ramírez and Claudia Sandoval-Montes for facilitating Rag2^{-/-} mice; Paola Mina-Osorio for critical revision of the manuscript; and Dario Vignali, Leopoldo Flores, Michael Neuberger, Rogelio Hernández-Pando, and Jesús Martínez-Barnette for kindly providing mice, reagents or help.

References

- Itano, A. A. and Jenkins, M. K., Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 733–739.
- Sunshine, G. H., Jimmo, B. L., Ianelli, C. and Jarvis, L., Strong priming of T cells adoptively transferred into scid mice. *J. Exp. Med.* 1991. 174: 1653–1656.
- Epstein, M. M., Di Rosa, F., Jankovic, D., Sher, A. and Matzinger, P., Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1995. 182: 915–922.
- Cassell, D. J. and Schwartz, R. H., A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 1829–1840.
- Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. and Bottomly, K., B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4 T cells to protein antigens in vivo. *J. Immunol.* 1995. 155: 3734–3741.
- Morris, S. C., Lees, A. and Finkelman, F. D., In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells. *J. Immunol.* 1994. 152: 3777–3785.
- Constant, S., B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4 T cell priming in vivo. *J. Immunol.* 1999. 162: 5695–5703.
- Evans, D. E., Munks, M. W., Purkerson, J. M. and Parker, D. C., Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J. Immunol.* 2000. 164: 688–697.
- Gerloni, M., Rizzi, M., Castiglioni, P. and Zanetti, M., T cell immunity using transgenic B lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2004. 101: 3892–3897.
- Liu, Y., Ramarathnam, L., Guo, A., Huszar, D., Trounstein, M. and Zhao, M., Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 response. *Int. Immunol.* 1995. 7: 1353–1362.
- Macaulay, A. E., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T., Antigen-primed T cells from B cell-deficient JHD mice fail to provide B cell help. *J. Immunol.* 1998. 160: 1694–1700.
- Clark, M. R., Massenburt, D., Siemasko, K., Hou, P. and Zhang, M., B cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 2004. 16: 382–387.
- Baumgarth, N., A two-phase model of B cell activation. *Immunol. Rev.* 2000. 176: 171–180.
- Ranheim, E. A. and Kipps, T. J., Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med.* 1993. 177: 925–935.
- Roy, M., Aruffo, A., Ledbetter, J., Linsley, P., Kehry, M. and Noelle, R., Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25: 596–603.
- Faassen, A. E., Dalke, D. P., Berton, M. T., Warren, W. D. and Pierce, S. K., CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25: 3249–3255.
- Clatza, A., Bonifaz, L. C., Vignali, D. A. and Moreno, J., CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J. Immunol.* 2003. 171: 6478–6487.
- Ozaki, M. E., Coren, B. A., Huynh, T. N., Redondo, D. J., Kikutani, H. and Webb, S. R., CD4 T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs. *J. Immunol.* 1999. 163: 5250–5256.
- Buhmann, J. E., Foy, T. M., Aruffo, A., Crassi, K. M., Ledbetter, J. A., Green, W. R., Xu, J. C., Shultz, L. D., Roopesian, D., Flavell, R. A., Fast, L., Noelle, R. J. and Durie, F. H., In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity* 1995. 2: 645–653.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. and Jenkins, M. K., Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998. 281: 96–99.
- Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J. and Flavell, R. A., Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994. 1: 423–431.
- Lindgren, H., Axcrone, K. and Leanderson, T., Regulation of transcriptional activity of the murine CD40 ligand promoter in response to signals through TCR and the costimulatory molecules CD28 and CD27. *J. Immunol.* 2001. 166: 4578–4585.
- Cook, M. C., Basten, A. and Fazekas de St. Groth, B., Influence of B cell receptor ligation and TCR affinity on T-B collaboration in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 4037–4049.
- Lenschow, D. J., Sperling, A. I., Cooke, M. P., Freeman, G., Rhee, L., Decker, D. C., Gray, G., Nadler, L. M., Goodnow, C. C. and Bluestone, J. A., Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J. Immunol.* 1994. 153: 1990–1997.
- Grewal, I. S., Foellmer, H. G., Grewal, K. D., Xu, J., Hardardottir, F., Baron, J. L., Janeway, C. A. Jr. and Flavell, R. A., Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996. 273: 1864–1867.
- Townsend, S. E. and Goodnow, C. C., Abortive proliferation of rare T cells induced by direct or indirect antigen presentation by rare B cells in vivo. *J. Exp. Med.* 1998. 187: 1611–1621.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritshard-Briscoe, H., Wotherspoon, J., Loblay, R. H. and Raphael, K., Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988. 334: 676–682.
- Ho, W. Y., Cooke, M. P., Goodnow, C. C. and Davis, M. M., Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1994. 179: 1539–1549.
- Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. and Hodgkin, P. D., Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* 1999. 77: 516–522.