



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Papel de CD38 en la diferenciación de los Linfocitos B inmaduros de bazo murino

Tesis que presenta
Juan Carlos Rodríguez Alba

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

(Inmunología)

Director de la Tesis: *Dr. Leopoldo Santos Argumedo*

México, D. F.

Abril de 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez.

Gabriel García Márquez

Ella está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá, nunca la alcanzaré. ¿Entonces para que sirve la utopía?. Para eso, sirve para caminar.

Eduardo Galeano

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biomedicina molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., en el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo, profesor titular de este departamento.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (donativo 40218-Q y 56836), así mismo, agradezco la beca crédito que recibí durante mis estudios de doctorado (163264).

DEDICATORIAS

A mi madre, la persona a quien debo mi existencia, quien durante toda la vida me ha ayudado a seguir adelante, sin su mano no hubiese conseguido la felicidad que me rodea.

A mi familia: A mi esposa que tiene la paciencia y cariño cada día (y principalmente el “valor” de vivir conmigo), a Julio Cesar a quien deseo: Algún día tenga la dicha y felicidad que ahora siento con su existencia.

A mis hermanos: Héctor y fam, Jesús, Martha y fam, quienes me han demostrado estar conmigo, tanto en momentos difíciles como gratos. A mi tía Isabel: quien ha estado con nosotros en todo momento y nos ha brindado también su apoyo y cariño.

A mi padre: Q.E.P.D. Donde sea que este, tenga la satisfacción de ver una familia unida, sana y feliz!!!.

A doña Celia, pues sin su ayuda ni siquiera hubiese (mos) podido sobrevivir a las épocas universitarias de las “vacas flacas”. A mis Amigos: Cayo, Miguel, Mariano, Neftalí, Adrián, Blanca, Omar y Silvia. De manera especial a Aníbal por aquella estancia compartida, a sus papas por la ayuda de esa época y de siempre... lo mismo para Jimmy y Fernando.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme el grado de Doctor en Ciencias. En forma especial al Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados por permitir el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por permitirme ser parte de su laboratorio, por su tiempo, comentarios, recomendaciones y regaños, que han impulsado el desarrollo de este trabajo y principalmente mi superación personal... por su amistad ... GRACIAS!!!.

Al Maestro en Ciencias. Héctor Romero Ramírez, por su apoyo técnico y académico, pero sobre todo por su amistad y compañerismo dentro y fuera del laboratorio.

Al Q. F. B. Víctor Hugo Rosales García, por su disposición y ayuda en el uso de los equipos de citometría de flujo, su tiempo en las largas horas de purificaciones celulares y el convivio constante.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Miguel, Claudia, Gaby López, Laura, Adriana Sumosa, Nataly, Tamara, David, José Luís, Alexander, Felipe, Gabriela Vallejo, el Sr. Manuel, el Sr. Estudillo, Lalo, Luís, Haydee, Elena... por el apoyo que me brindaron todos y cada uno de ellos en alguna parte de la Maestría y el Doctorado... Gracias por su amistad, por ayudarme en todo momento durante estos años, por tolerar mi carácter (si es que ocurría). Además, por soportar aquellas ocasiones en que mi autoestima no estaba en el nivel que debía y me ayudaron a reponerme, los voy a extrañar...

INDICE

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE TABLAS | v |
| LISTA DE ABREVIATURAS | vi |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Desarrollo del LcB en médula ósea. | 1 |
| Desarrollo del LcB en periferia. | 5 |
| Desarrollo del LcB dependiente de antígeno. | 9 |
| Señales del BCR involucradas en la maduración del LcB. | 10 |
| La molécula CD38. | 16 |
| CD38 en la diferenciación celular. | 19 |
| JUSTIFICACIÓN | 22 |
| HIPÓTESIS | 23 |
| OBJETIVO GENERAL | 24 |
| Objetivos particulares. | 24 |
| MATERIALES Y METODOS | 25 |
| Animales. | 25 |
| Suspensiones celulares. | 25 |
| Conteo y viabilidad de las células. | 26 |
| Anticuerpos y tinción de citometría de flujo. | 26 |
| Purificación de las subpoblaciones de LcB. | 27 |

| | |
|--|-----------|
| Ensayos de proliferación, diferenciación y apoptosis. | 28 |
| Ensayos tipo “Western blot”. | 30 |
| Ensayos de fosforilación por citometría de flujo. | 31 |
| Análisis estadístico. | 31 |
| RESULTADOS | 32 |
| Expresión de CD38 durante la diferenciación de los LcB esplénicos. | 32 |
| CD38 induce la proliferación de LcB T2 y M. | 36 |
| Anti-CD38 induce diferenciación de los LcB T2 esplénicos. | 43 |
| El estímulo con anti-CD38 induce la apoptosis de la subpoblación de LcB T1. | 49 |
| El estímulo con anti-CD38 requiere de las moléculas de señalización Lyn, Fyn, PI3K y Erk para inducir la proliferación de los LB T2. | 54 |
| CD38 requiere de las moléculas Lyn, Fyn, Btk, PI3K y Erk, pero no PLC- γ 2 para promover la diferenciación de los LcB T2. | 56 |
| El estímulo con anti-CD38 induce la fosforilación de Erk en los LcB T2. | 59 |
| DISCUSIÓN | 61 |
| CONCLUSIONES | 67 |
| PERSPECTIVAS | 68 |
| REFERENCIAS | 69 |
| ANEXO | 76 |
| Artículo obtenido de los hallazgos de esta tesis. | 76 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas de la linfopoyesis de las células B.
- Figura 2.** Modelo de desarrollo periférico de los linfocitos B.
- Figura 3.** Señales de transducción activadas por el BCR en el linfocito B.
- Figura 4.** Modelo cristalográfico de CD38.
- Figura 5.** La población de LcB T2 posee un mayor tamaño y granularidad que los LcB T1 y M.
- Figura 6.** Existe un incremento en el porcentaje de LcB T2 y una disminución de LcB T1 en el ratón deficiente de CD38.
- Figura 7.** Purificación de LcB T1, T2 y M.
- Figura 8.** Titulación del anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38) en LcB totales.
- Figura 9.** El estímulo anti-CD38 induce la proliferación de los LcB T2.
- Figura 10.** La actividad enzimática de CD38 no participa en la proliferación inducida en los LcB T2.
- Figura 11.** El estímulo con anti-CD38 promueve la diferenciación de los LcB T2.
- Figura 12.** El estímulo anti-CD38 no es capaz de inducir la diferenciación de los LcB T1.
- Figura 13.** El estímulo anti-CD38 induce la diferenciación de una población muy pura LcB T2.
- Figura 14.** El estímulo con anti-CD38 induce la apoptosis de los LcB T1.

- Figura 15.** Apoptosis de los LcB T1 después del entrecruzamiento de CD38.
- Figura 16.** La apoptosis de los LcB T1 es promovida por el estímulo anti-CD38.
- Figura 17.** La vía de señalización de CD38 requiere a las moléculas Lyn, Fyn, PI3K y Erk para inducir la proliferación de los LcB T2.
- Figura 18.** CD38 requiere a Lyn, Fyn, Btk, PI3K, y Erk, pero no a la PLC- γ 2 para promover diferenciación de los LcB T2.
- Figura 19.** El entrecruzamiento de CD38 en los LcB T2 induce la fosforilación de la cinasa Erk y este efecto requiere de la activación de la PI3-K.
- Figura 20.** Vía de señalización activada por CD38 para inducir proliferación y diferenciación de los LcB T2.

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Diferenciación de los LcB T1 y T2 ante el estímulo anti-CD38.

Tabla II. Arresto en la diferenciación de los LcB T2 en ratones con defectos en la señalización.

Tabla III. Inhibición de la diferenciación inducida por anti-CD38 por diferentes drogas que interfieren con la señalización intracelular.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|--|
| LcB | Linfocitos B. |
| LcT | Linfocitos T. |
| CMP | Célula Madre Pluripotencial. |
| E2A | Factor de transcripción E2A. |
| BCR | Receptor de la Célula B. |
| TCR | Receptor de la Célula T. |
| mb-1 | Gen que codifica para la proteína CD79 alfa. |
| RAG1/2 | Genes activadores de recombinación 1 y 2. |
| VpreB | Cadena ligera “sustituta”. |
| EBF | Factor de transcripción de unión a E2A. |
| IgHC | Cadena pesada de inmunoglobulina. |
| IgLC | Cadena ligera de inmunoglobulina. |
| IgM | Inmunoglobulina μ . |
| IgG | Inmunoglobulina γ . |
| pre-BCR | Pre-Receptor de la Célula B. |
| IL-7R | Receptor para la interleucina 7. |
| HSA | Antígeno estable al calor (CD24). |
| Igα | Cadena α del heterodímero de unión a IgM. |
| Igβ | Cadena β del heterodímero de unión a IgM. |
| LcB T1 | LcB Transicionales 1. |
| LcB T2 | LcB Transicionales 2. |

| | |
|---------------------------------|---|
| LcB T3 | LcB Transicionales 3. |
| LcB M | LcB maduros foliculares. |
| LcB ZM | LcB de zona marginal. |
| IL-2 | Interleucina 2. |
| IL-4 | Interleucina 4. |
| IL-5 | Interleucina 5. |
| IL-6 | Interleucina 6. |
| CG | Centro Germinal. |
| PTK | Proteína tirosina cinasa. |
| SYK | Tirosina cinasa del bazo. |
| LYN | Tirosina cinasa del sarcoma viral de Yamaguchi. |
| ITAM | Motivos de activación basados en tirosina. |
| ITIM | Motivos de inhibición basados en tirosina. |
| BTK | Tirosina cinasa de Bruton. |
| PLC-γ2 | Fosfolipasa-C γ 2. |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinasa. |
| PtdinsP2 | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. |
| PtdInsP3 | Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. |
| PH | Dominios de homología a plecstrina. |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trisfosfato. |
| DAG | Diacilglicerol. |
| Ca²⁺ | Calcio. |
| PKC | Proteína cinasa C. |
| MAPK | Proteínas cinasas activadas por mitógeno. |

| | |
|-------------------|--|
| ERK | Cinasa regulada por señales extracelulares. |
| JNK | Cinasa NH ₂ -terminal c-JUN. |
| NF-κB | Factor nuclear-κB. |
| NFAT | Factor nuclear activado por células T |
| VAV | Factor intercambiador de nucleótidos de guanina. |
| RAC1 | GTPasa de la familia de Rho. |
| PIRB | Receptor B tipo inmunoglobulina. |
| SHP-1 | Proteína tirosina fosfatasa-1. |
| SHIP | Proteína fosfatasa de inositol polifosfato 5'. |
| BCAP | Adaptador de la célula B para PI3K. |
| BAM32 | Adaptador de la célula B de 32 kDa. |
| MHC-II | Complejo principal de histocompatibilidad II. |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana. |
| XID | Inmunodeficiencia ligada al cromosoma X. |
| 8-Br-cADPR | 8-bromo-adenosina difosfato ribosa cíclico. |
| LPS | Lipopolisacárido. |
| IP | Yoduro de propidio. |
| BAFF | Factor activador de la célula B. |
| WB | Ensayos tipo "Western Blot". |

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL LcB EN MEDULA OSEA

Los **linfocitos B (LcB)**, como el resto de las células hematopoyéticas provienen de un antecesor común o célula madre pluripotencial (CMP) a partir de la cual se producen todas las células hematopoyéticas, así, la expresión de distintos receptores, factores de transcripción y genes para cada etapa del desarrollo de estas células¹ son importantes para que se comprometan hacia el linaje de LcB. El desarrollo del LcB inicia en hígado fetal o en la médula ósea en el recién nacido, proceso que inicia con el compromiso de una célula pluripotencial que es capaz de iniciar su maduración hacia la etapa denominada **Pro-B** donde la expresión de diversos factores como el factor de transcripción E2A², regulan genes importantes del linaje de LcB que tienen como objetivos primordiales: a) producir el **Receptor de la Célula B (BCR)** necesario para el reconocimiento de los diferentes antígenos y crear diversidad de anticuerpos y b) permitir el desarrollo de esta estirpe celular. El factor E2A induce la transcripción de genes que incluyen a los genes mb-1 (que codifica para la cadena alfa del heterodímero asociado a IgM), lambda 5, RAG1/2 y VpreB. Las células B que no expresan este factor de transcripción tienen un bloqueo en la maduración³. Otra molécula importante es el factor EBF que es regulado por E2A⁴, la expresión de este factor asegura el compromiso hacia el linaje de LcB⁵.

La siguiente fase de la transición de los LcB se denomina **pre-B** y depende principalmente del arreglo y expresión de uno de los dos alelos del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgHC)⁶, la presencia de la IL-7 está asociada con la maduración en este estadio⁷. A lo largo de esta etapa ocurren cambios en los arreglos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas mediante complejos enzimáticos producidos por la activación de los genes RAG1 y RAG2, a este mecanismo se le ha denominado recombinación V(D)J de genes de inmunoglobulinas^{8,9}. En este proceso uno de los segmentos de la región de Diversidad (D) se une a uno de los segmentos de Unión (J) y posteriormente a uno de los segmentos Variables (V). Este “rearreglo” de genes genera la producción de una cadena de inmunoglobulina en la superficie celular cuya expresión dará inicio a la formación del **Pre-Receptor de la Célula B (pre-BCR)** que está conformado por una cadena pesada “anclada” a la membrana (mHC), así como por VpreB y lambda 5 (que forman a una cadena denominada “sustituta” que ocupará el lugar de la cadena ligera convencional durante esta etapa) y el heterodímero Igα/Igβ^{10,11}. Se ha sugerido que la expresión y señalización a través del pre-BCR son necesarias para el desarrollo y sobrevivencia de los LcB, debido a que en su ausencia el LcB es arrestado en esta etapa¹²⁻¹⁵. Además, se ha propuesto que señales a través del Pre-BCR inhiben la recombinación en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina IgH (proceso conocido como exclusión alélica), esto facilita la selección positiva y el paso de célula Pro-B a Pre-B. Cabe resaltar que señales a través de IL-7R facilitan la expansión clonal e inicia la recombinación del locus de la cadena ligera de inmunoglobulina convencional

(IgLC)^{16,17}, donde la expresión de cada una de estas proteínas es necesaria para la maduración de LcB en esta fase.

La transición de la etapa pre-B a **LcB inmaduro** es el siguiente paso en la maduración del LcB y este será el punto final de su desarrollo en la médula ósea. Este paso está asociado con una proliferación baja de estas células, disminución en la expresión de los genes que codifican para la cadena “sustituta”, así como incremento de los genes de rearrreglos de inmunoglobulinas, arreglo y expresión de la cadena ligera “convencional” que se asociará con la cadena pesada y el heterodímero Ig α /Ig β para formar el BCR en la superficie del LcB. Se ha propuesto que en esta etapa el LcB puede ser eliminado por selección negativa debido a su capacidad para reconocer antígenos a través del BCR de clonas autoreactivas¹⁸, es decir, que reconozcan antígenos propios del organismo, así mismo, pueden ocurrir eventos de selección positiva que podrían facilitar el avance en la maduración de estas células para convertirse finalmente en células B periféricas de larga vida¹⁹ (Figura 1).

Esquema de diferenciación de los linfocitos B.

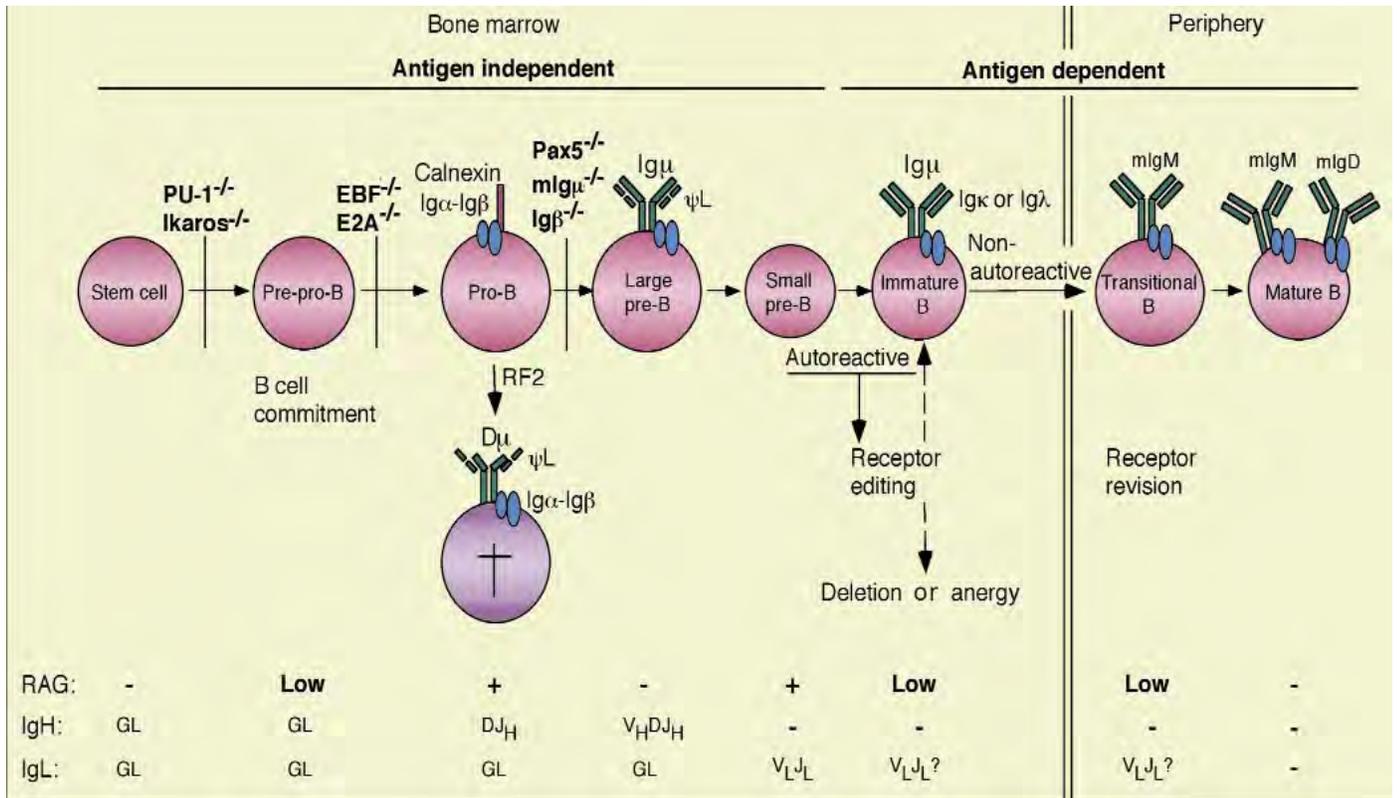


Figura 1 Etapas de linfopoyesis de las células B. El cuadro indica las etapas de maduración del LcB: Pre-pro B, expresión de los genes RAG y arreglo de cadenas pesadas (IgH) y ligeras (IgL). Etapa pro-B, expresión de calnexina e Igα-Igβ, pre-B, expresión de Igμ, ΨL e Igα-Igβ, célula B inmadura con BCR. (Meffre E y cols. *Nat immunol*, 2000)

DESARROLLO DEL LcB EN PERIFERIA

Una vez que se han llevado a cabo los arreglos productivos de los genes de inmunoglobulina IgHC e IgLC, el BCR es expresado en la superficie de la célula B, ahora ésta célula está lista para migrar hacia los órganos linfoides secundarios, principalmente al bazo, donde tratará de completar su maduración. Aproximadamente, 20 millones de células B inmaduras (expresando BCR) son producidas diariamente en la médula ósea del ratón, sin embargo, menos del 20 % de éstas logran sobrevivir y convertirse en células B maduras^{20,21}. Esta pérdida se ha asociado en parte a la competencia por el espacio en los órganos linfoides secundarios, además de la selección negativa de clones autorreactivos que son eliminadas por apoptosis²²⁻²⁴.

Las células B que migran de la médula ósea al bazo aún exhiben características fenotípicas similares, es por ello que se les considera todavía células inmaduras, a esta población de LcB en periferia se le ha denominado “**Linfocitos B transicionales**” y marcan un eslabón entre las células inmaduras de médula ósea y las células maduras en el bazo. Diferentes grupos han subdividido a las células transicionales en distintos subgrupos denominados **LcB Transicionales 1 (T1)** o **Transicionales 2 (T2)**, basándose principalmente en los marcadores de superficie y características funcionales como proliferación y apoptosis²⁵⁻²⁸. De esta forma los LcB T1 pueden ser distinguidos por la expresión diferencial de los marcadores de superficie IgM^{alto} IgD^{neg} $CD21^{neg}$ $CD23^{neg}$ ²⁷, estas células parecen ubicarse cerca de las placas perioarterioláres en el bazo. Por su parte los LcB T2 pueden ser separados por su expresión de IgM^{alto} , IgD^{alto} ,

CD21^{alto}, CD23^{alto}, además, a diferencia de los LcB T1, la población T2 se encuentra en la zona folicular del bazo^{27,29}. Tanto los LcB de médula ósea como de bazo son considerados inmaduros por la expresión de marcadores como CD24^{alto25,26} o CD93^{alto} que es reconocido por el anticuerpo AA4.1³⁰. Diversos grupos han tratado de separar a las diferentes subpoblaciones de LcB inmaduros con el uso de estos marcadores, debido a esto, ha sido difícil conciliar los criterios de purificación para cada subpoblación principalmente en la etapa de LcB T2. Por ejemplo, algunos estudios indican que al igual que los LcB inmaduros de médula ósea, ambas poblaciones de LcB T1 y T2 no proliferan “*in Vitro*” como respuesta al estímulo a través del BCR, sino que mueren por apoptosis^{28,31}. Sin embargo, otros estudios sugieren que estas 2 subpoblaciones de células transicionales tienen una respuesta diferencial al estímulo a través del BCR, es decir, la población LcB T1 muere por apoptosis a las pocas horas del entrecruzamiento del BCR, mientras que los LcB T2 proliferan y se diferencian hacia un fenotipo de LcB maduro folicular (M)^{28,32,33}, además, en este caso se detecta un incremento en la expresión de moléculas de activación y de sobrevivencia por parte de la población de LcB T2²⁸. A la fecha, aún a no se ha determinado la razón por cual se presentan estas diferencias, aunque recientemente otro grupo ha tratado de conciliar los resultados anteriores sugiriendo que la población de células B T2 que son separadas por el anticuerpo AA4.1³¹ son en realidad T1 y por ello no proliferan ante el estímulo a través del BCR^{34,35}. En todo caso, se ha aceptado que la transición de los LcB avanza en el sentido LcB T1 > LcB T2 > LcB M (Figura 2). Finalmente, una población adicional de linfocitos B transicionales ha sido definida como **LcB Transicionales 3 (T3)**³¹, ésta población tiene características muy semejantes a las

de la población LcB T2, aunque con una expresión de IgM^{bajo}, estudios en estas poblaciones muestran que al igual que los LcB T1, no proliferan ante el entrecruzamiento del BCR³¹, además, se ha propuesto que las células de esta población sean posiblemente LcB T2 que se encuentran en estado de anergia³⁶. Es importante puntualizar que los experimentos anteriores se han realizado en su totalidad en el sistema murino, sin embargo, estas poblaciones también han sido descritas en el humano con características muy similares, como el hecho de que las poblaciones inmaduras de LcB humanos no proliferan y disminuye el número de estas células en presencia de estímulos a través del BCR^{37,38}.

Modelo de maduración del LcB en periferia

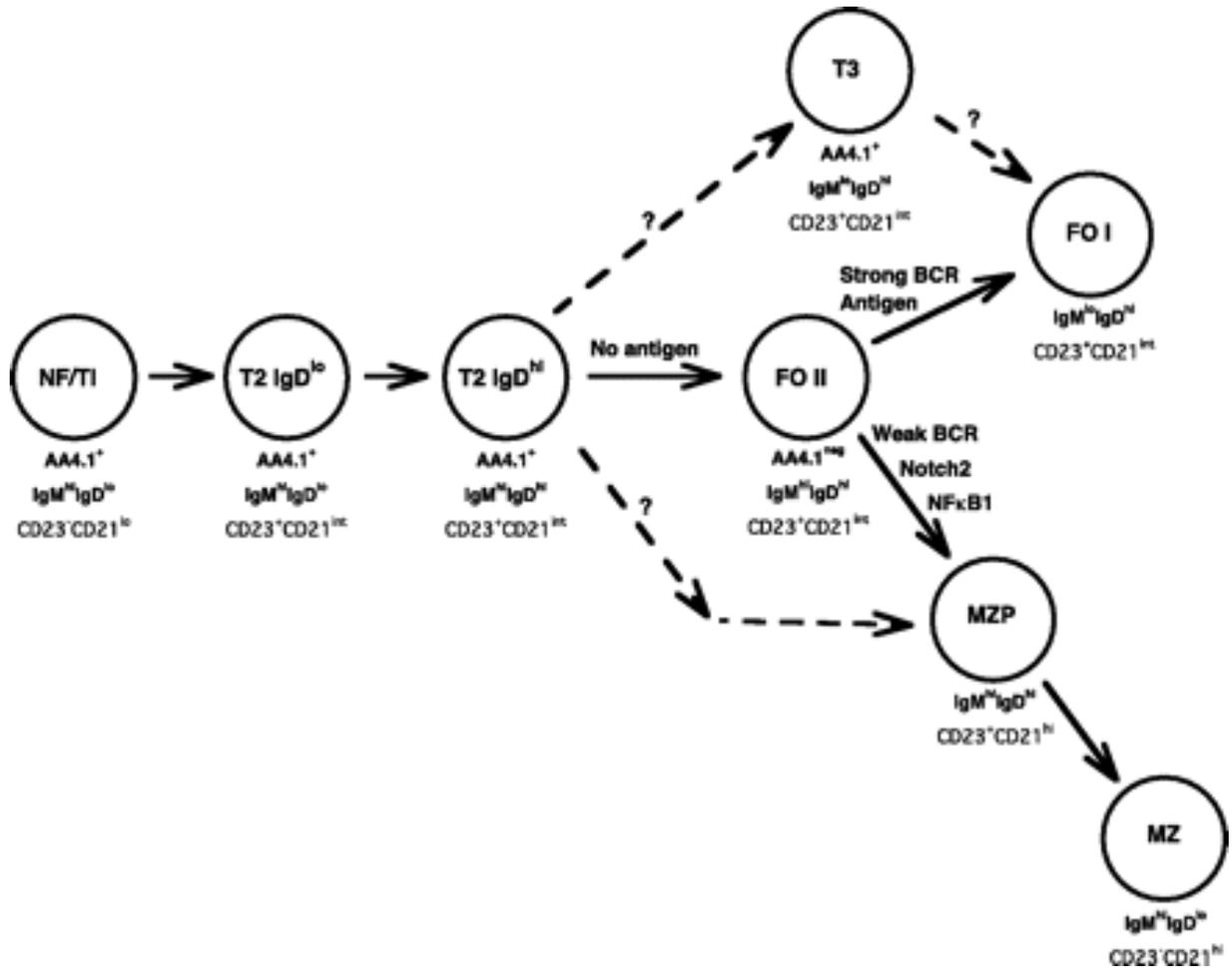


Figura 2. Modelo de desarrollo periférico de los linfocitos B. Este modelo muestra la transición de los LcB recién llegados al bazo en ausencia de antígeno. Los marcadores de inmadurez característicos como AA4.1 o CD24 son mostrados y las líneas indican la maduración en cada etapa NF/T1, T2 y T3 hasta convertirse en célula B madura. Dependiendo de la intensidad del estímulo, el LcB transicional 2 puede convertirse en una célula folicular (FOI) o una célula de zona marginal (MZ). (Cariappa A. *J Immunol* 2007)

DESARROLLO DEL LcB DEPENDIENTE DE ANTÍGENO

En la zona marginal de la pulpa blanca esplénica se localiza otra subpoblación de LcB que se especializa en la producción de anticuerpos naturales³⁹, estas células reciben el nombre de **LcB de Zona Marginal (ZM)** y se encuentran en contacto constante con macrófagos especializados en la captura de bacterias y otros antígenos particulados procedentes de la circulación sanguínea que fluye por el seno marginal³⁷. Estos macrófagos pueden estimular a los LcB ZM promoviendo su maduración hacia células productoras de anticuerpos naturales o a células con función presentadora de antígeno⁴⁰. Existen distintas teorías acerca del origen de los LcB ZM, las cuales sugieren que estas provienen de los LcB T2²⁷, mientras que otros modelos indican que la intensidad de la señal a través del BCR podría influir en este compromiso, de manera que señales intensas a través del BCR producen LcB foliculares, mientras que señales débiles inducen la producción de LcB ZM⁴¹. Por otra parte, estas células pueden ser activadas por diferentes mecanismos. Los antígenos denominados T-independientes como los polisacáridos y lípidos presentan múltiples epítomos antigénicos equivalentes, lo cual facilita el entrecruzamiento de los BCR's en la superficie del LcB, así, éstas células pueden ser activadas directamente sin necesidad de la colaboración de otras células. La respuesta humoral que se deriva de ésta interacción se compone principalmente de anticuerpos de isotipo IgM con muy baja afinidad por su antígeno y además no produce una memoria importante⁴². Los antígenos T dependientes de origen protéico (principalmente) no pueden activar la respuesta humoral por si solos, es decir, la diferenciación hacia células productoras de

anticuerpos y células de memoria depende de la interacción con **Linfocitos T (LcT)** cooperadores CD4+, que son específicos para el mismo antígeno. La respuesta humoral frente a este tipo de antígenos se caracteriza por la producción de anticuerpos con diferentes isotipos, con gran afinidad y con una alta capacidad para inducir memoria⁴³. Una vez que los LcB han sido estimulados y cuya capacidad presentadora y coestimuladora ha sido potenciada, están listos para activar a los LcT CD4+ a través del **Receptor de la Célula T (TCR)** y de CD28. A su vez los LcT activados incrementan la expresión de CD40L y de citocinas tipo IL-2, IL-4 e IL-6. La suma de estos factores inducen la estimulación y activación de los LcB que se especializan en la producción de anticuerpos o migran de nuevo a los folículos linfoides para formar un **Centro Germinal (CG)**⁴⁴. Una vez en el CG los LcB activados se diferencian a plasmablastos. La activación vía CD40 induce el cambio de isotipo de inmunoglobulina⁴⁵, que es determinado por las citocinas que hayan sido producidas por los LcT cooperadores. Tras la expansión clonal de los plasmablastos estos derivan hacia células plasmáticas que residen en las zonas extrafoliculares o en la pulpa roja (en el caso del bazo), en donde los anticuerpos que se produzcan serán liberados inmediatamente al torrente sanguíneo⁴⁶.

SEÑALES DEL BCR INVOLUCRADAS EN LA MADURACIÓN DEL LcB

La vía de señalización del BCR es importante en la maduración del LcB, de tal modo que al igual que los LcB inmaduros de médula ósea, los LcB T1 periféricos no proliferan por estímulo a través del BCR, por su parte los LcB T2 y

M proliferan y se diferencian ante el mismo estímulo, sugiriendo que las vías de señalización para cada etapa de maduración podría ser diferente; algunas de estas diferencias podrían ser explicadas por el hecho de que los LcB maduros poseen una mayor cantidad de BCR dentro de membranas ricas en lípidos o “balsas lipídicas” a diferencia de los LcB inmaduros que poseen menos moléculas de BCR dentro de estas balsas^{47,48}.

La vía de señalización del BCR ha sido ampliamente estudiada y una gran cantidad moléculas asociadas a esta vía de señalización han sido descritas, así, de manera general tras el estímulo a través del BCR se activan las proteínas tirosina cinasa (PTK's): SYK y LYN (tirosina cinasa del bazo y sarcoma viral de Yamaguchi, respectivamente), la proteína LYN fosforila los sitios de activación basados en inmunoreceptor de tirosina (motivos ITAM) en el tallo citoplásmico del heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$, los cuales a su vez reclutan y facilitan la activación de SYK y BTK (tirosina cinasa de Bruton)⁴⁹, la cual es una PTK de la familia de TEC (tec proteína tirosina cinasa). En este proceso también pueden ser activadas otras PTK's de la familia de SRC como son: FYN, BLK FGR y HCK, aunque mutaciones en FYN, BLK y FGR tienen un efecto menor en la función de los LcB^{50,51}, posiblemente porque éstas moléculas pueden efectuar alguna función redundante en la maduración de los LcB.

Una vez que han sido activadas BTK y SYK, éstas fosforilan y activan PLC- γ 2 (fosfolipasa-C γ 2) que junto con la proteína PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa) conforman dos enzimas claves que generan segundos mensajeros en la señalización a través del BCR⁵². PI3K fosforila PtdinsP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) para producir PtdInsP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), a su vez, éste

recluta otras moléculas a la membrana del LcB a través de sus dominios PH (homología a plecstrina). Por su parte, la PLC- γ 2 usa PtdInsP2 (el mismo sustrato de PI3K) para generar IP3 (inositol-1,4,5-trisfosfato) y DAG (diacilglicerol) quienes son requeridos para la liberación de calcio intracelular (Ca^{2+}) y la activación de la PKC (proteína cinasa C), respectivamente⁵²⁻⁵⁴. Subsecuentemente, la activación de PKC y el flujo de Ca^{2+} inducen la activación de proteínas cinasas de la familia de MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno), que incluyen a ERK (cinasa regulada por señales extracelulares), JNK (cinasa NH2-terminal c-JUN) y p38-MAPK, así como factores de transcripción que incluyen a NF- κ B (factor nuclear- κ B) y a NFAT (factor nuclear activado por células T). Es probable que la activación de estos factores de transcripción determine cada etapa de maduración en la que se encuentre el LcB.

Otra proteínas que pueden activarse tras el entrecruzamiento del BCR son las GTPasas VAV (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) de la familia de RHO, que consisten de al menos tres isoformas -VAV1, VAV2 y VAV3-⁵⁵, todas ellas cruciales para la señalización del BCR. Por ejemplo, la proteína VAV activa a RAC1 (un miembro de la familia de la GTPasa Rho) y regula la estructura del citoesqueleto⁵⁶, la mutación de estas proteínas generan defectos en la proliferación de estas células y en la movilización de calcio intracelular inducida por el BCR⁵⁷. Algunos autores han sugerido que VAV esta implicado en la señalización río abajo de PI3K debido a que posee un dominio PH, mientras que SYK fosforila y regula la actividad de PI3K en los Linfocitos B⁵⁸.

Es importante mencionar que estas vías de señalización están controladas por reguladores que incluyen co-receptores del BCR como es el caso de PIRB

(receptor B tipo inmunoglobulina) y FcγRIIB, los cuales poseen dominios de inhibición basados en tirosina (ITIM) en su tallo citoplásmico y tienen como función el reclutamiento de proteínas fosfatasa que contienen SHP-1 (proteína tirosina fosfatasa-1 con un dominio-SH2) y SHIP (proteína fosfatasa de inositol polifosfato 5' con un dominio-SH2), las cuales se encargan de inhibir la señal producida por el BCR⁵⁹. El co-receptor CD22 regula la señal del BCR tanto positiva como negativamente, el reclutamiento de la proteína adaptadora GRB2 a el tallo citoplásmico de CD22 induce la activación de las proteínas MAPK, mientras que el reclutamiento de SHP1 a dominios ITIM en el tallo citoplásmico de CD22 bloquea la señal del BCR⁶⁰. Por otro lado, existen moléculas adaptadoras importantes en la regulación de la señal emitida por el BCR como es el caso de BLNK (proteína adaptadora del linfocitos B) que une a Btk y PLC-γ2⁶¹, BCAP (adaptador de la célula B para PI3K)⁶² y BAM32 (adaptador de la célula B de 32 kDa) que se une a PLCγ2 y regula su activación^{63,64} o el co-receptor CD19 que puede funcionar como un adaptador para PI3K, Lyn o SyK e incrementa la señal a través del BCR⁶⁵. De esta forma, tanto co-receptores como adaptadores están encargados de modular la calidad y cantidad de la señal emitida por el BCR, a su vez, el reclutamiento del BCR y moléculas de membrana a las “balsas lipídicas” son importantes en el inicio de la señalización a través del BCR^{66,67} (Figura 3).

Vías de señalización en los linfocitos B

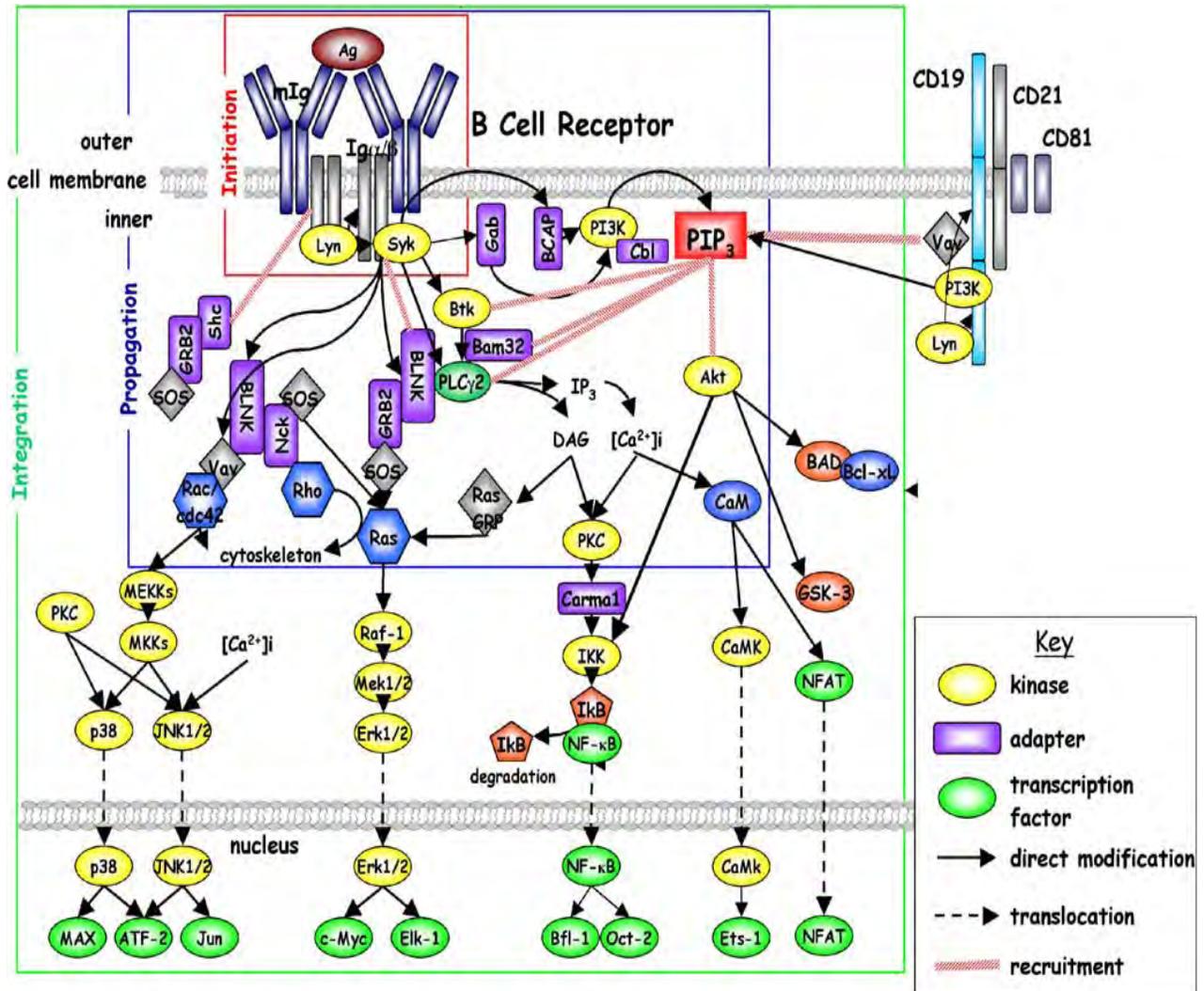


Figura 3. Señales de transducción activadas por el BCR en el linfocito B. La vía de señalización inicia tan pronto como un antígeno se une al BCR cuyo entrecruzamiento induce la fosforilación de distintas moléculas intracelulares como se indica en la figura. Finalmente, la cascada de señalización activa diversos factores de transcripción y se da la expresión de diversos genes. Existen diversas moléculas como CD19 o CD22, que influyen incrementando o reduciendo la intensidad de la señal, el cuadro a la derecha indica el efecto que se da en cada ruta (Dal Porto JM y cols Mol. Immunol 2004).

A lo largo de la maduración de los LcB se regulan positiva y negativamente diversas moléculas según la etapa de la ontogenia en que se encuentra la célula. Dentro de las moléculas que se expresan desde etapas tempranas de la diferenciación del LcB encontramos a CD38, esta molécula se encuentra desde el estadio donde existe un compromiso hacia el linaje de LcB en médula ósea hasta el bazo donde estas células alcanzan su madurez. La siguiente es una descripción de los aspectos más importantes de la función descrita de CD38.

LA MOLÉCULA CD38.

CD38 es una glicoproteína de cadena sencilla, tipo-II, de 42 kDa, que se expresa en células de diversos tejidos tanto hematopoyéticos (especialmente linfocitos B, T, NK y macrófagos) como no hematopoyéticos (cerebro, páncreas, hueso)⁶⁸. Esta conformada por una región citoplasmática de 23 aminoácidos, una región transmembranal de 22 aminoácidos y una región extracelular de 259 aminoácidos, así como, 4 sitios potenciales de glicosilación. CD38 es una proteína bifuncional, debido a que se ha observado que posee funciones tanto enzimáticas, como de receptor celular⁶⁹.

Como **ectoenzima**, se ha reportado que el dominio extracelular de CD38 puede catalizar la conversión de β -NAD⁺ a ADP-ribosa (ADPR) más nicotinamida y en menor grado convierte ADPR a ADPRcíclica (cADPR), que actúa principalmente sobre receptores de ryanodina⁶⁹. El cADPR ha sido considerado el metabolito más importante, debido a que es un segundo mensajero capaz de movilizar el calcio que se encuentra en almacenes internos como el retículo endoplásmico⁷⁰. Aunque aún no están claros los requerimientos estructurales para que CD38 realice su función, se ha propuesto que CD38 podría estar expresado como homo-dímeros, cuyos monómeros estarían asociados no covalentemente⁷¹. La actividad enzimática de esta molécula la realiza su porción extracelular⁷². Diversos grupos han señalado que la actividad enzimática de CD38 es importante para mediar diversas funciones en la señalización intracelular⁶⁹.

Por otra parte, se ha demostrado que CD38 posee actividad de **receptor** en la superficie celular (Figura 4). A pesar que la región citoplasmática de esta molécula no contiene sitios que le permitan interactuar con proteínas de señalización, se ha demostrado que la incubación de LcB de bazo de ratón con anticuerpos anti-CD38 (por ejemplo NIM-R5) induce diversas respuestas celulares tales como: proliferación, movilización de calcio, fosforilación de proteínas, rescate e inducción de apoptosis, migración y sobreexpresión de diversas proteínas de superficie como: MHC-II, CD69 y la cadena alfa del receptor de la IL-5^{69,73-80}. CD38 se expresa desde etapas tempranas en la diferenciación de los LcB⁸¹, es por ello que ha sido considerado un marcador de diferenciación⁸²⁻⁸⁴. En todos estos casos los anticuerpos simulan la función de un posible ligando de CD38 y se ha reportado que alguno de estos ligandos podrían ser: *CD31* (un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresado mayoritariamente en células endoteliales, linfoides, pulmonares y hepáticas)⁸⁵, el *ácido hialurónico* (un componente de matriz extracelular)⁸⁶ o alguna proteína en la membrana de las células dendríticas⁸⁷.

Estructura del receptor CD38

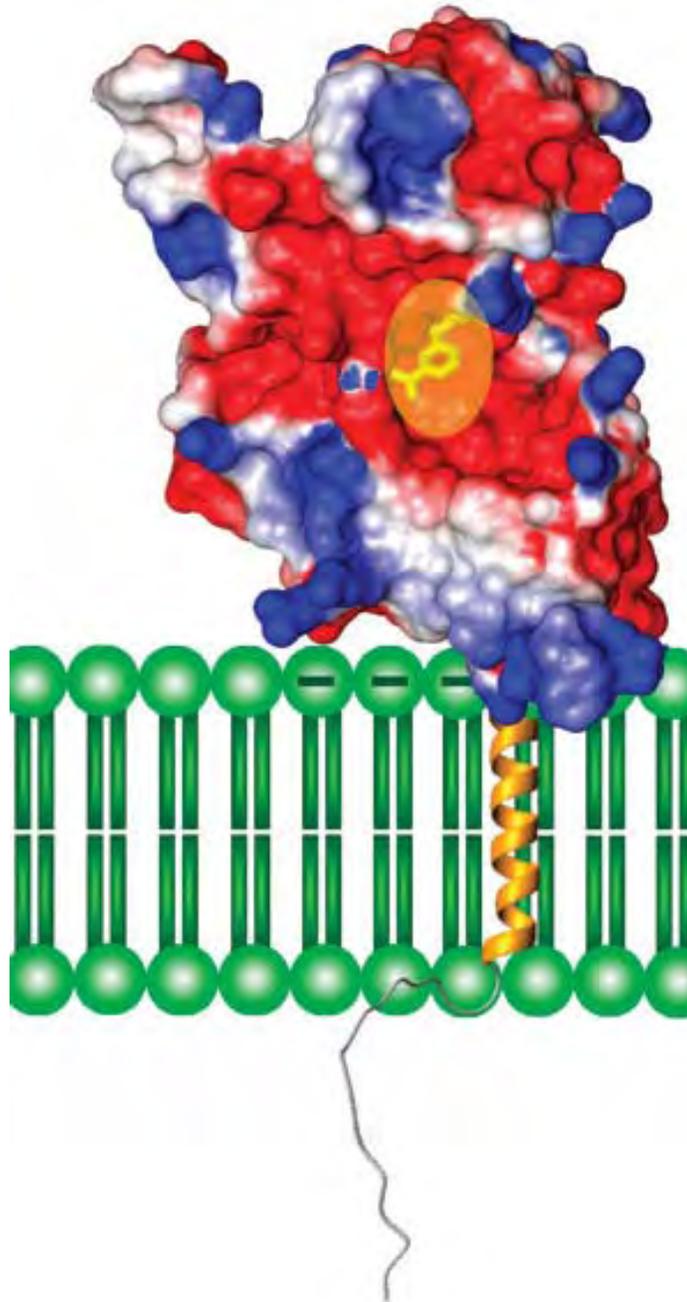


Figura 4. Modelo cristalográfico de CD38. Se muestra el dominio extramembranal con sus regiones cargadas negativamente en color rojo y positivamente en azul, el ovalo amarillo indica el sitio activo de su actividad enzimática. La región extramembranal es color oro mientras que el tallo N-terminal es la línea final. En verde se representan los fosfolípidos de membrana (*Lee HC, Mol Med, 2006*).

Algunos autores han descrito que la función celular de CD38, además de lo mencionado anteriormente, puede ser participando como un regulador de la activación y proliferación celular, dependiendo de la etapa de diferenciación de las células^{68,70}. Además, se ha sugerido que CD38 pudiera participar en la adhesión entre linfocitos y células endoteliales⁸⁸. Por otra parte, sumado a su función en la maduración de estas células, CD38 puede tener valor pronóstico en diversas enfermedades como son: infecciones por VIH, sarcoidosis pulmonar y tumores prostáticos, donde su presencia es indicativa de activación celular. Así, la expresión de CD38 varía durante el desarrollo y maduración de los linfocitos y esta expresión puede estar alterada bajo condiciones patológicas⁸⁹.

CD38 EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

De acuerdo a reportes previos, CD38 se expresa a lo largo de la ontogenia de los LcB en ratones de diferentes edades⁸¹, posiblemente desde etapas tempranas en la médula ósea, probablemente desde el estadio pro-B; es por ello que se le considera un marcador temprano en la diferenciación de estas células. CD38 se expresa junto con CD45R (B220), que es uno de los marcadores tempranos de diferenciación en las células B. En el modelo murino, éstas células expresan niveles moderados de CD38 en etapas inmaduras que aumentan con la maduración. CD38 se expresa antes que otras moléculas importantes en la ontogenia del LcB como son: el BCR (IgM), CD21 o CD19. De esta manera, los

niveles de CD38 parecen estar regulados según la etapa de maduración de la célula.

Como ya se mencionó, la función que realiza CD38 en los LcB ha sido ampliamente demostrada^{71,76,81,90-92}. Además, se ha sugerido que CD38 podría tener algún vínculo con moléculas importantes en la maduración de los LcB como el BCR o CD19^{92,93}, de esta manera, es probable que una o más rutas de señalización puedan ser semejantes en la activación de estas moléculas. Datos recientes indican que CD38 requiere parcialmente componentes de señalización usados por el BCR o CD19, aunque no necesariamente los mismos^{90,92}. Sin embargo, en ninguno de los casos anteriores se ha podido encontrar asociación física entre CD38 y las otras moléculas.

La actividad de CD38 se ha evaluado en poblaciones de linfocitos murinos totales de medula ósea, bazo y otros órganos^{81,90}, demostrándose una participación de esta molécula en la maduración o muerte de estas células. Sin embargo, la función de CD38 no se ha analizado en una población de LcB específica durante la ontogenia de las células B por lo que un estudio detallado en LcB purificados nos indicaría con claridad si CD38 efectúa distintas funciones en cada etapa de la maduración de LcB. Como se mencionó anteriormente, los LcB inmaduros de bazo provenientes de médula ósea se han denominado “transicionales” y tienen una actividad aparentemente diferente ante estímulos a través del BCR, según la etapa de desarrollo, es por eso, que decidimos evaluar si CD38 es capaz de inducir la proliferación y maduración o la apoptosis de estas

poblaciones inmaduras de células B periféricas y evaluar si esta respuesta es dependiente de CD38 o es exclusiva de otras moléculas como el BCR.

RESUMEN

La molécula CD38 es un receptor de superficie capaz de inducir la activación, proliferación, maduración sobrevivencia y protección de apoptosis de linfocitos en seres humanos y en ratones; esta molécula se expresa en la superficie de linfocitos B inmaduros y maduros. En el presente trabajo se analizó la expresión y la función de CD38 en la maduración de poblaciones inmaduras de linfocitos B en el bazo. Nuestros resultados muestran que se encuentra altamente expresado en linfocitos B Transicionales 2 (T2), mientras que los linfocitos B Transicionales 1 (T1) y maduros foliculares (M) tienen una menor expresión. De acuerdo con esta expresión elevada de CD38, los linfocitos B T2 son células más grandes y tienen una mayor granularidad que los T1 y M. Además, los linfocitos B T2 tienen mayor expresión de otras moléculas de activación sobre su superficie, lo cual indica que tienen un fenotipo de célula activada. El entrecruzamiento de CD38 promueve la proliferación y maduración de los linfocitos B T2, mientras que en claro contraste los linfocitos B T1 mueren por apoptosis. Finalmente, el estímulo con anti-CD38 en linfocitos B T2 provenientes de ratones deficientes en la expresión de Btk, Lyn o Fyn, mostraron disminución en la proliferación y diferenciación; de la misma forma, la presencia de drogas que inhiben a las moléculas PI3K o ERK indujeron una disminución de la proliferación y diferenciación inducida por CD38 en la población T2. Por otra parte, la adición de la droga 8-BrcADPR no afectó la proliferación o diferenciación promovida por el estímulo, sugiriendo que la actividad enzimática de CD38 no participa en estos eventos. En conjunto, los resultados mostrados en este trabajo indican que estas moléculas participan en la vía de señalización de CD38 e indican que esta molécula juega una función importante en la regulación de la maduración de los linfocitos B en el bazo.

Abstract

The CD38 molecule is a surface receptor able to induce activation, proliferation, maturation, survival and protection from apoptosis of human and murine lymphocytes; this molecule is expressed on the surface of both mature and immature B cells. In this work, the expression of CD38 and its function in the maturation of murine immature B lymphocytes in the spleen were analyzed. The results showed that CD38 is highly expressed on Transitional 2 B lymphocytes with an intermediate expression on Transitional 1 and mature follicular B cells. Correlating with a high expression of CD38, T2 cells are also larger and more granular than T1 or M B cells. T2 cells also showed high levels of other molecules, which indicate an activated phenotype. CD38 crosslinking induced proliferation and maturation of T2 B lymphocytes; in contrast, T1 subset died by apoptosis. Finally, CD38 stimulation of T2 B lymphocytes obtained from Btk, Lyn or Fyn deficient mice, showed a defective differentiation; similarly, the preincubation with several drugs interfering with PI3K or ERK activation decreased the proliferation or differentiation of the T2 subset. The addition of 8-BrcADPR did not affect the proliferation or differentiation of T2 B cells, suggesting that the enzymatic activity of CD38 did not participate in these events. All together, these results suggest that these molecules participate in the CD38 signaling pathway and indicate that CD38 plays an important role in the regulation of B cell maturation in the spleen.

HIPÓTESIS

El estímulo a través de CD38 induce la proliferación de linfocitos B totales maduros, por otra parte, induce la muerte de poblaciones inmaduras, por lo tanto, CD38 debe tener una función en la maduración, dependiendo de la etapa de la ontogenia en que se encuentren éstas células.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la función de CD38 en la diferenciación de linfocitos B esplénicos en las etapas T1, T2 y M de ratones silvestres o deficientes en la expresión de CD38.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la expresión de CD38 en las poblaciones de linfocitos B esplénicos de la cepa C57BL/6 silvestre.

Evaluar la proliferación inducida con anti-CD38 en cada una de las subpoblaciones purificadas de LcB T1, T2 y M.

Determinar si el estímulo con anti-CD38 es capaz de promover la diferenciación de las subpoblaciones T1 o T2 hacia un fenotipo de células B madura.

Analizar si existe apoptosis de alguna de las poblaciones purificadas ante la el entrecruzamiento de anti-CD38.

Analizar moléculas de señalización que pudieran estar implicadas en la respuesta inducida por CD38 como son: Btk, Lyn, Fyn, PI3K, PLC- γ 2 y Erk.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que CD38 se expresa desde etapas tempranas de la diferenciación de linfocitos B, desde la médula ósea hasta el bazo, es importante determinar su expresión en poblaciones purificadas como es el caso de los LcB T1, T2 y M en bazo murino, así como evaluar si CD38 tiene una función en la proliferación, diferenciación o muerte de estas poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se emplearon las siguientes cepas de ratones: C57BL/6 silvestre, C57BL/6 CD38^{-/-}, B6.129 silvestre, B6.129 Lyn^{-/-}, B6.129 Fyn^{-/-}, BALB/c silvestre y BALB/c XID hembras, todas ellas obtenidas del biotério del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN (CINVESTAV), con edades de 6-8 semanas.

Suspensiones celulares.

Los ratones de cada cepa fueron sacrificados por dislocación cervical, se obtuvo el bazo y se colocó en una caja Petri con 5 ml de PBS (solución de buffer de fosfatos 1X). El bazo se disgregó con ayuda de una malla de acero inoxidable y un embolo de jeringa. A continuación se recogieron las células en un tubo y se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en PBS, para eliminar a los eritrocitos se añadieron 5 ml de solución de cloruro de amonio al 0.85% (NH₄Cl 150 mM, 10 mM de bicarbonato de potasio y 0.1 mM de EDTA) por 3-4 minutos, a continuación se lavó 2 veces con PBS y se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 ml de PBS.

Conteo y viabilidad de las células

Para contar las células y medir su viabilidad, se realizó una dilución 1:10 de las células con azul de tripano a 0.4%, colocando 10 µl de la suspensión celular más 90 µl de azul de tripano. Posteriormente, se cargó una cámara de Neubauer con 10 µl de la dilución. Finalmente se contaron las células en el área para glóbulos blancos (4 esquinas) en un microscopio con objetivo de 40x, usando la siguiente relación.

CALCULOS

$(\# \text{ Total de células} / 4)(\text{Dilución}=10)(\text{Factor}=10000) = \text{células} / \text{ml}.$

Anticuerpos y tinción de citometría de flujo

Para la tinción de moléculas de superficie se utilizaron un millón de esplenocitos suspendidos en un volumen no mayor a 100 µl de PBS conteniendo BSA al 1% y NaN_3 al 0.01% (PBA). Las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: anti-CD21-FITC, anti-B220-Sprd, anti-CD24-biotina, anti-CD38-PE (NIM-R5) (Pharmingen/BD Biosciences, San José, CA) y como control de isotipo IgG1 de rata acoplada a biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham Al). Los esplenocitos fueron incubados por 15 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después de la incubación las células fueron lavadas con PBA y teñidas con estreptavidina-APC (Pharmingen). Se incubaron

por 20 minutos en la oscuridad y después las células fueron lavadas con PBA y fijadas con solución FixFacs (PBA y formaldehído al 1%). Los datos fueron adquiridos en el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y analizados con el uso del programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Otras moléculas de superficie que se analizaron haciendo tinciones cuádruples incluyeron los siguientes anticuerpos: anti-IgM-PE, anti-IgD-PE, anti-CD5-PE, anti-MHC-II-PE, anti-CD44-PE, anti-CD25-PE, anti-CD23-PE (Southern Biotech) y estreptavidina-APC

Purificación de las subpoblaciones de LcB

Para purificar cada población de LcB T1, T2 y M en condiciones estériles, una suspensión de esplenocitos (2×10^8) de cada una de las cepas de ratones, fue filtrada en una malla de tela y recuperada en PBS estéril. Posteriormente estas células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: anti-B220-PerCP (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), anti-CD21-FITC, anti-CD23-PE y anti-CD24-biotinilado (Southern Biotech.) y fueron incubadas en hielo por 15 minutos en la oscuridad. Después fueron lavadas con medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island NY), para enseguida teñirlas con estreptavidina-APC por 20 minutos en hielo, teniendo cuidado de agitar cada 3-4 minutos. Una vez teñidas, las suspensiones celulares fueron purificadas en el citómetro FACSVantage (Becton-Dickinson, San José, CA). Cada población purificada fue recolectada en 0.5 ml de suero fetal bovino al 10% frío (Gibco). La viabilidad fue evaluada como ya se describió anteriormente y

la pureza obtenida fue mayor a 95%. Finalmente, las células fueron cultivadas inmediatamente.

Ensayos de proliferación, diferenciación y apoptosis

Después de la purificación $1-2 \times 10^5$ células de cada población de LcB purificadas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (Gibco), 100 μ M de aminoácidos no esenciales (Sigma Chemicals, St. Louis MO), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco), 0.2 mg/ml de Penicilina (Gibco), 0.5 mg/ml de estreptomicina (Gibco) 2 mM de glutamina (Gibco) y 5.5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol (Gibco). En algunos experimentos las poblaciones purificadas fueron preincubadas 30 minutos con cada una de las siguientes drogas: 30 μ M de LY294002 (inhibidor de PI3K) (Calbiochem, San Diego, CA), 25 μ M de PD98056 (inhibidor de la MAPK Erk) (Calbiochem), 200 nM de U-73122 (inhibidor de PLC- γ 2) o 200 nM del análogo inactivo U-73343 (Calbiochem), 100 μ M de 8-Br-cADPR (8-bromo-cyclic adenosine diphosphate ribose) (Sigma) o medio suplementado. Después las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos en ensayos por triplicado y estimuladas con IgG de rata (50 μ g/ml), IgG2a de rata (50 μ g/ml) (Zymed, San Francisco, CA), anti-CD38 (NIM-R5) (50 μ g/ml), F(ab')₂ anti-IgM (10 μ g/ml) (MP/Cappel, Irvine, CA) o LPS (E. coli 055:B5) (20 μ g/ml), con o sin la adición de IL-4 200 U/ml (Genzyme, Cambridge, MA). Las placas fueron incubadas 24 y 48 horas a 37°C. Ocho horas antes de la cosecha las células fueron pulsadas con 1 μ Ci de [³H]-timidina (25 Ci/mmol) (Amersham/GE Healthcare, Piscataway, NJ). Posteriormente las células

fueron cosechadas y la incorporación de [³H]-timidina al DNA fue cuantificada en un contador de centelleo (Beckman LS 6500, Fullerton, CA).

Con el objetivo de evaluar la diferenciación celular, los LcB purificados fueron estimulados como se describió anteriormente. En algunos experimentos se utilizó una concentración menor de anti-CD38 (25 µg/ml) o F(ab')₂ anti-IgM (5 µg/ml). Después de la incubación con los diferentes estímulos las células fueron cosechadas, lavadas con medio y finalmente reteñidas con los anticuerpos primarios descritos anteriormente. Los datos fueron adquiridos en el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y analizados con el uso del programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Para determinar apoptosis, los LcB T1 fueron estimulados como se ha descrito anteriormente y fueron cosechados 12 y 24 horas después. Posteriormente, las poblaciones fueron lavadas con buffer de unión de anexina V (Pharmingen) y posteriormente teñidas con Anexina V-biotinilado (Pharmingen) 10-15 minutos de acuerdo a indicaciones de la casa comercial. Después de la incubación las células fueron lavadas y teñidas con estreptavidina-APC por 20 minutos, finalmente, fueron lavadas y teñidas con yoduro de propidio (Sigma). En algunos experimentos las células fueron permeabilizadas 2 horas con metanol frío al 90% (Baker, Phillipsburg, NJ), posteriormente teñidas con yoduro de propidio. Los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACSVantage cell sorter (BD Biosciences) y analizados con el programa FlowJo software (Tree Star Inc.).

Ensayos tipo “Western blot”.

Para los ensayos “Western blot”, dos millones de LcB T2 B fueron estimulados 1, 5 y 10 minutos con IgG de rata (50 µg/ml) o anti-CD38 (50 µg/ml) o F(ab')₂ anti-IgM (20 µg/ml). En algunos experimentos las células fueron preincubadas 30 minutos con 30 µM de LY294002 (inhibidor de PI3K), 25 µM de PD98056 (Inhibidor de Erk) o el vehículo (DMSO). Después de la estimulación, las células fueron lisadas con un buffer que contiene 10 mM de Tris/HCl (pH 7.3) (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM de Na₃VO₄ (Sigma), 0.4 mM de EDTA (Baker), 10 mM de NaF (Sigma), 1 mM de Fenilmetanesulfonil fluoro (Sigma), 2 µg/mL de Aprotinina (Sigma), 2 µg/mL de Leupeptina (Roche, Indianápolis, IN) y Nonidet P-40 al 1% (v/v) (Sigma). Cantidades equivalentes de proteína fueron cargadas en un gel al 10% (SDS-PAGE). Después de la separación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, éstas fueron incubadas con anti-fosfo-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, Beverly, MA) o anti-ERK-2 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA). Las membranas fueron marcadas con anticuerpos anti-IgG-HRP de ratón (Zymed) o anti-IgG-HRP de conejo (DakoCytomation, Carpenter, CA). Finalmente, las proteínas fueron detectadas por medio del kit ECL-Plus (Amersham/Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Ensayos de fosforilación por citometría de flujo.

La fosforilación de Erk fue analizada por citometría de flujo. Un millón de esplenocitos fueron estimulados 10 minutos tal y como se describió en el caso del “Western blot”, en algunos experimentos las células fueron preincubadas 30 minutos con 25 μ M de PD98056 (Calbiochem) o el vehiculo (DMSO). Después de la estimulación la células fueron fijadas con formaldehído al 10% (Sigma) y permeabilizadas con metanol al 90% frío (Baker). Posteriormente, fueron teñidas con un anticuerpo anti-fosfo-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling) por 15 minutos y a continuación se agregó un anticuerpo anti-IgG1-PE (Southern Biotech.). Mas adelante, las células fueron reteñidas con anti-CD21-FITC y anti-CD24-biotinilado y finalmente estreptavidina-APC. Los datos fueron adquiridos en el FACSVantage cell sorter (BD Biosciences) y analizados con el programa de computo FlowJo (Tree Star Inc.).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos que son señalados fue evaluado con la prueba t-Student, donde una P menor a 0.05 se consideró como significativa.

RESULTADOS

Expresión de CD38 durante la diferenciación de los LcB esplénicos

Para estudiar la expresión de CD38 en las subpoblaciones de LcB en bazo, se obtuvieron esplenocitos totales de ratones silvestres y deficientes en la expresión de CD38 en el fondo genético C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad. Esplenocitos totales positivos en la expresión de la molécula B220 fueron seleccionados, posteriormente los linfocitos positivos para CD21 y CD24 fueron separados en regiones como se muestra en la Figura 5. En un análisis detallado, observamos que Los LcB T2 son células con un mayor tamaño y granularidad que los LcB T1 y M. Posteriormente las diferentes subpoblaciones de LcB T1 (CD24^{alto}, CD21^{bajo}), T2 (CD24^{alto}, CD21^{alto}) y M (CD24^{bajo}, CD21^{intermedio}) fueron separadas y el porcentaje de cada subpoblación fue evaluado de acuerdo con Loder F y cols²⁷. Los resultados muestran que los porcentajes de cada subpoblación en el ratón silvestre correlacionan con reportes previos^{27,28} (Figura 6A). Sorprendentemente, el porcentaje de las subpoblaciones inmaduras de LcB de bazo en el ratón deficiente en la expresión de CD38 fue diferente y estadísticamente significativa a su contraparte en el ratón silvestre, así, el porcentaje de LcB T2 del ratón deficiente en la expresión de CD38 fue menor que en el ratón silvestre, por otra parte, el número de LcB T1 aumentó en el ratón deficiente en la expresión de CD38, lo cual sugeriría que CD38 pudiera ser requerido en la maduración de estas células en esta etapa del desarrollo (Figura 6A-B). Además, en esta parte inicial decidimos medir la expresión de CD38 en cada una de las etapas de maduración

y observamos que esta molécula se encuentra altamente expresada en la subpoblación de LcB T2 comparada con la T1 y M (Figura 6C). Por otra parte, moléculas como IgM, IgD, MHC-II, CD5, CD44, CD25 y CD23 también fueron evaluadas y nuestros resultados muestran que estas moléculas se encuentran también altamente expresadas en la población T2 (Figura 6C), sugiriendo que los LcB T2 tienen un fenotipo de células activadas en esta etapa de maduración y diferenciación a célula B madura.

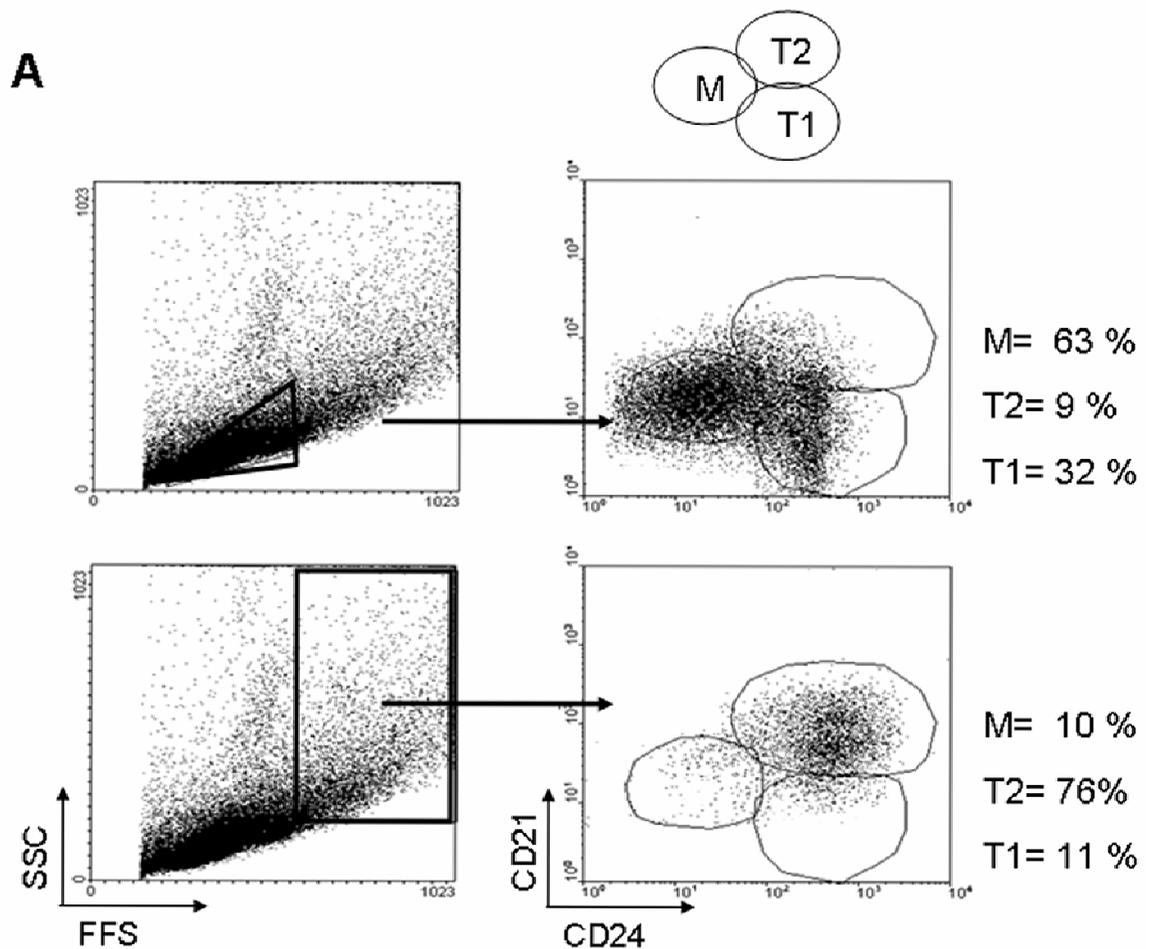


Figura 5. La población de LcB T2 posee un mayor tamaño y granularidad que los LcB T1 y M. Esplenocitos totales fueron teñidos con anti-CD21, anti-CD24 y anti-B220. Posteriormente, fueron analizados de acuerdo a su tamaño y granularidad celular. La expresión de CD21 y CD24 fue evaluada en células B220 positivas, posteriormente se crearon regiones para definir a las subpoblaciones de LcB T1, T2 y M. Los números a la derecha indican el porcentaje de cada subpoblación y cada gráfica de puntos es representativa de tres experimentos diferentes.

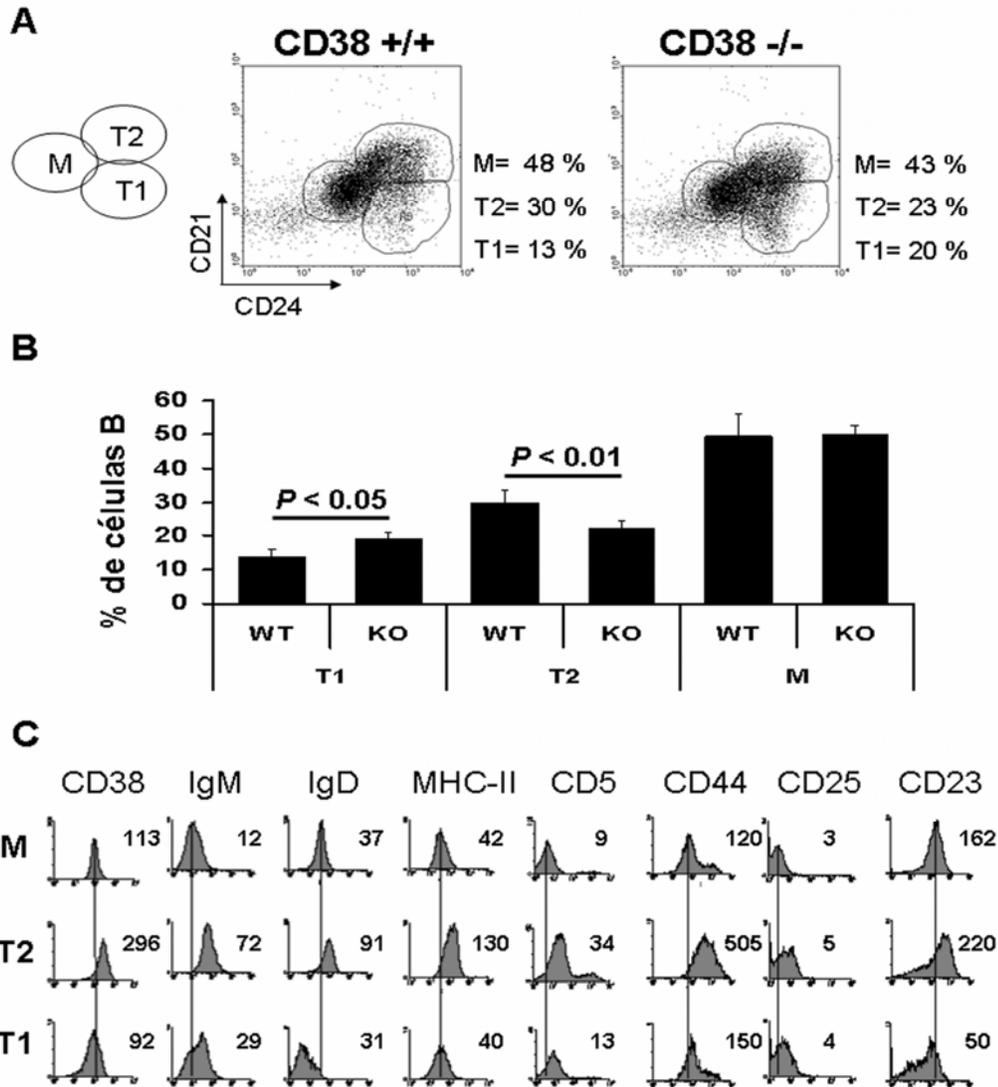


Figura 6. Existe un incremento en el porcentaje de LcB T2 y una disminución de LcB T1 en el ratón deficiente de CD38. Esplenocitos totales fueron seleccionados en la región B220 positiva y el porcentaje de cada población de LcB T1, T2 y M fue calculada de acuerdo con la expresión de CD21 y CD24. (A) Gráficas de LcB T1, T2 y M de ratones Silvestres (WT) y deficientes en la expresión de CD38 (KO). (B) Porcentaje de LcB T1, T2 y M, los datos fueron obtenidos de 10 experimentos independientes. Los resultados indican el promedio y la desviación estándar donde el ensayo t-Student fue: $p < 0.05$ o $p < 0.01$ como se indica. (C) Expresión de CD38 y otras moléculas sobre las subpoblaciones de LcB T1, T2 y M. Cada histograma muestra la intensidad media de fluorescencia en cada subpoblación.

CD38 induce la proliferación de LcB T2 y M.

Reportes previos han demostrado que CD38 es capaz de inducir la proliferación y la activación de LcB totales esplenicos^{73,75,81,90}, por lo tanto, con el objetivo de analizar la proliferación inducida por el estímulo anti-CD38 en cada subpoblación purificada, LcB T1, T2 y M de ratones silvestres y deficientes en la expresión de CD38 C57BL/6 fueron purificados conforme a reportes previos^{27,28}. La pureza obtenida para los siguientes ensayos fue mayor al 95% para cada subpoblación (Figura 7). Para demostrar que las concentraciones de nuestros anticuerpos eran las óptimas, decidimos realizar una titulación de estos antes de iniciar los experimentos (Figura 8). Posteriormente las poblaciones purificadas fueron incubadas con los distintos anticuerpos a diferentes tiempos. Los resultados indican que los LcB T1 no son capaces de proliferar al estímulo a través de CD38, mientras que LcB T2 y M proliferan desde las 24 horas, efecto que es mas claro a las 48 horas (Figura 9A). Este efecto se incrementa con la adición de IL-4, aunque solo en la subpoblación de LcB T2 y M, mientras que los LcB T1 no responden al estímulo a pesar de la adición de IL-4 (Figura 9B). Estos datos sugirieron que CD38 podría tener una participación diferente según la etapa de maduración de estas células.

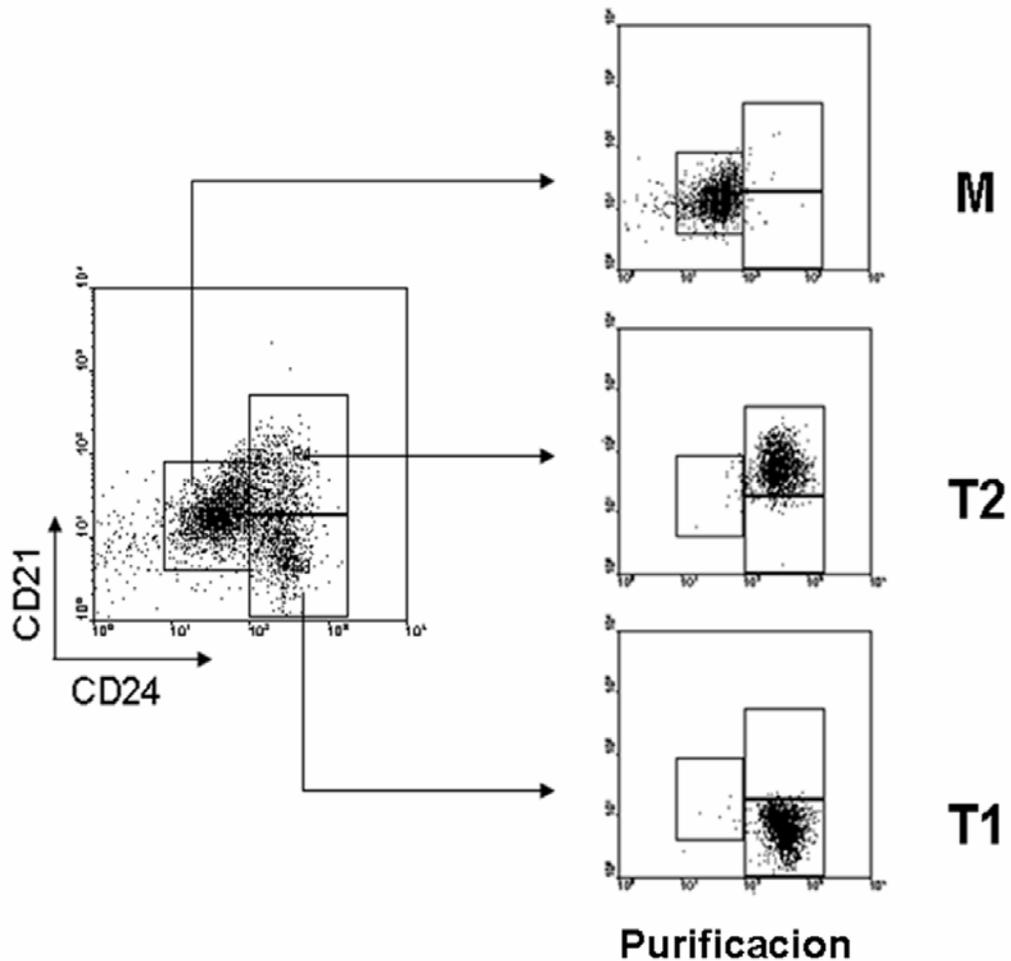


Figura 7. Purificación de LcB T1, T2 y M. Esplenocitos totales fueron teñidos y separados por la expresión de B220 (100%). Posteriormente, cada subpoblación fue separada considerando la expresión de CD21 y CD24. La pureza obtenida para cada subpoblación fue mayor al 95%. Las letras a la derecha representan a los LcB transicionales 1 (T1) (CD24^{alto} y CD21^{bajo}), LcB Transicionales 2 (T2) (CD24^{alto} y CD21^{alto}) o LcB maduros (M) (CD24^{bajo} y CD21^{intermedio}). Cada subpoblación purificada fue utilizada en los experimentos posteriores.

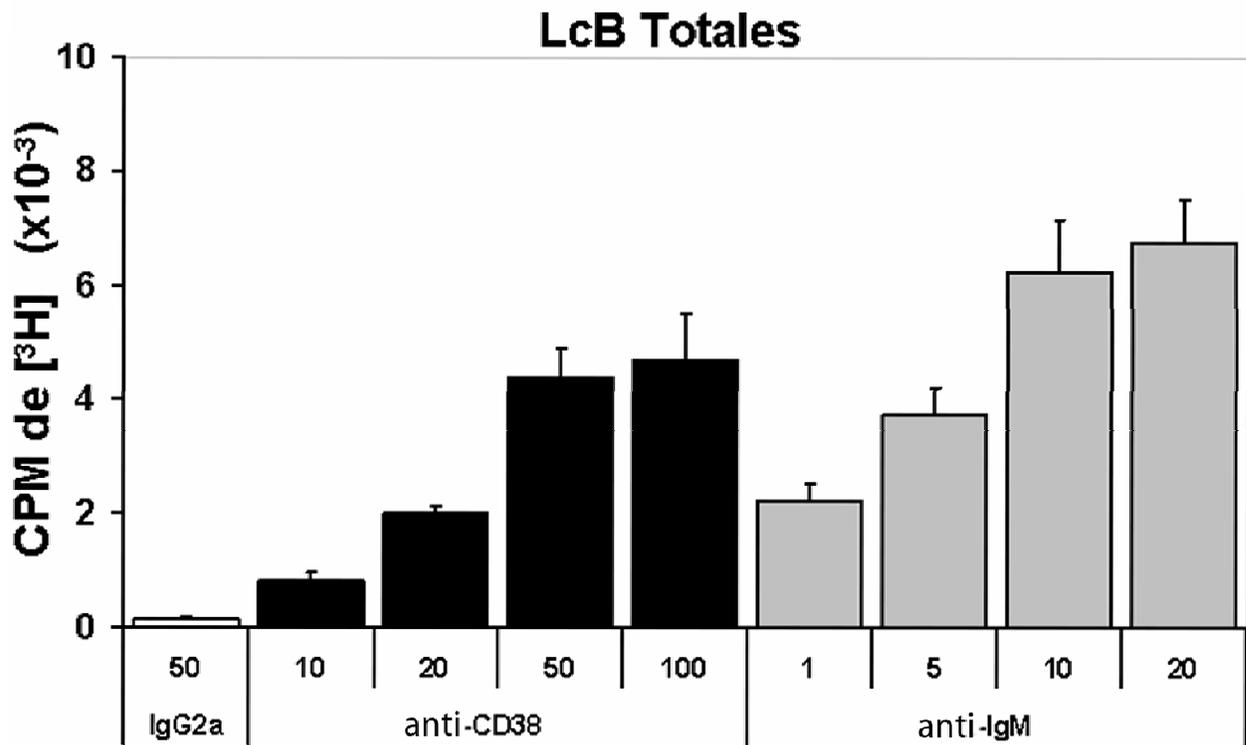


Figura 8. Titulación del anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38) en LcB totales. Esplenocitos totales fueron incubados por triplicado en presencia de IgG2a de rata (barras blancas), diferentes dosis de anti-CD38 (barras negras) o anti-IgM (barras grises) en placas de 96 pozos por 48 hrs 37°C. Ocho horas antes de ser cosechadas, las células fueron pulsadas con 1 µCi de timidina [³H]. Los números en la parte inferior indican la concentración de cada estímulo expresada en µg/ml, mientras que los números a la izquierda indican la proliferación de cada subpoblación expresada en CPM (cuentas por minuto) de timidina [³H].

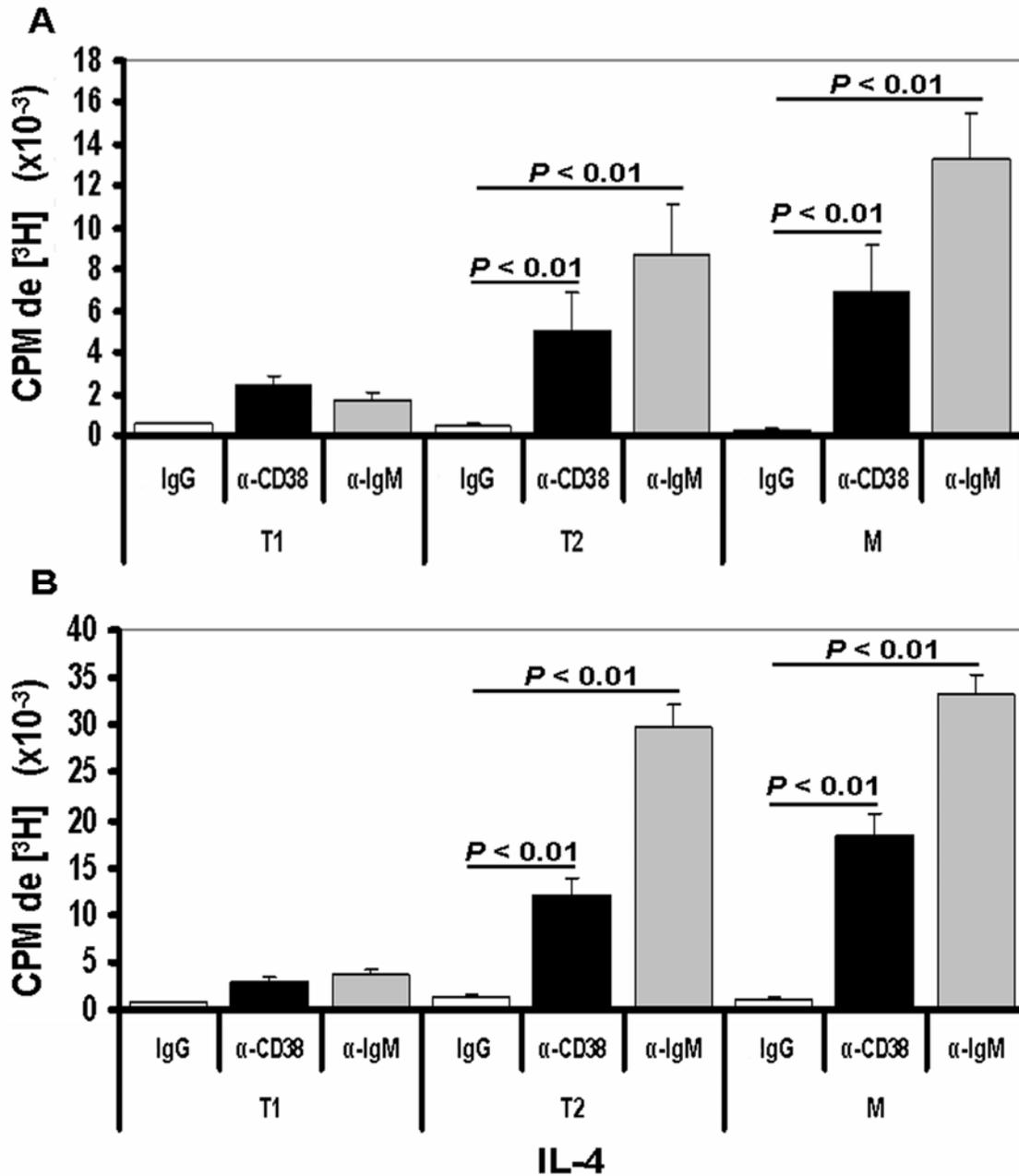


Figura 9. El estímulo anti-CD38 induce la proliferación de los LcB T2. LcB T1, T2 y M de ratones silvestres fueron purificados como se muestra en la figura 7. (A) Cada subpoblación fue estimulada por triplicado con IgG de rata (barras blancas) o anti-CD38 (barras negras) o anti-IgM (barras grises) en placas de 96 pozos. (B) LcB T1, T2 y M B fueron incubadas como en el panel A, mas la adición de IL-4. Las placas fueron incubadas 48 horas 37°C y 8 horas antes de su cosecha fueron pulsadas con 1 μCi/pozo de timidina [³H]. Los números a la izquierda indican la proliferación de cada subpoblación expresada en CPM de timidina [³H]. Los resultados indican el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes donde el análisis estadístico t-Student fue p<0.01 como se indica.

Como se mencionó anteriormente, es importante recordar que la actividad enzimática de CD38 es requerida para mediar funciones en el sistema inmune, especialmente aquellas relacionadas con la migración celular^{78,94}, aunque algunas de las funciones reguladas por CD38 pueden no requerir su actividad enzimática, es decir, la función como **receptor** de CD38 es la encargada de llevar a cabo el efecto biológico. Con el objetivo de analizar si la actividad enzimática de CD38 participa en la proliferación inducida por el anticuerpo monoclonal anti-CD38 en las subpoblaciones de LcB T1 y T2, estas fueron preincubadas con un inhibidor específico de la actividad enzimática de CD38, la droga 8-Br-cADPR (8-bromo-adenosina difosfato ribosa cíclico) a una concentración de 100 μ M. Se ha demostrado que en estas condiciones se bloquea eficientemente la actividad enzimática sin afectar la viabilidad y funcionalidad de las células⁷⁶. Los resultados muestran que los LcB T1 no proliferan con o sin la adición de 8-Br-cADPR (Figura 10A). Sin embargo, a pesar de la ausencia de proliferación con anti-CD38 o anti-IgM, estas células son capaces de proliferar ante la presencia de LPS demostrando que estas células son funcionales y capaces de responder a estímulos independientes de CD38 o el BCR como se ha demostrado anteriormente³¹. Por otra parte, el análisis de LcB T2 muestra que la estimulación con anti-CD38 es capaz de inducir la proliferación de esta subpoblación a pesar de la adición del inhibidor 8-Br-cADPR (Figura 10B), indicando que la actividad enzimática de CD38 no es requerida para que el anticuerpo monoclonal anti-CD38 induzca proliferación de los LcB T2. Es importante señalar que los LcB T2 del ratón deficiente en la expresión de CD38 parecen responder de manera semejante al ratón silvestre al estímulo a través del BCR (Figura 10B).

De esta manera, la suma de estos resultados sugieren que la actividad receptora de CD38 es importante en la inducción de la proliferación de los LcB T2. Además, esta actividad es independiente de su actividad enzimática. Estos resultados correlacionan con datos descritos anteriormente para otros sistemas^{76,91}. En contraste, anti-CD38 es incapaz de inducir proliferación de los LcB T1, dato que es semejante a reportes previos donde se indica que poblaciones inmaduras de bazo responden diferencialmente a estímulos a través de otros receptores, como es el caso del BCR²⁸.

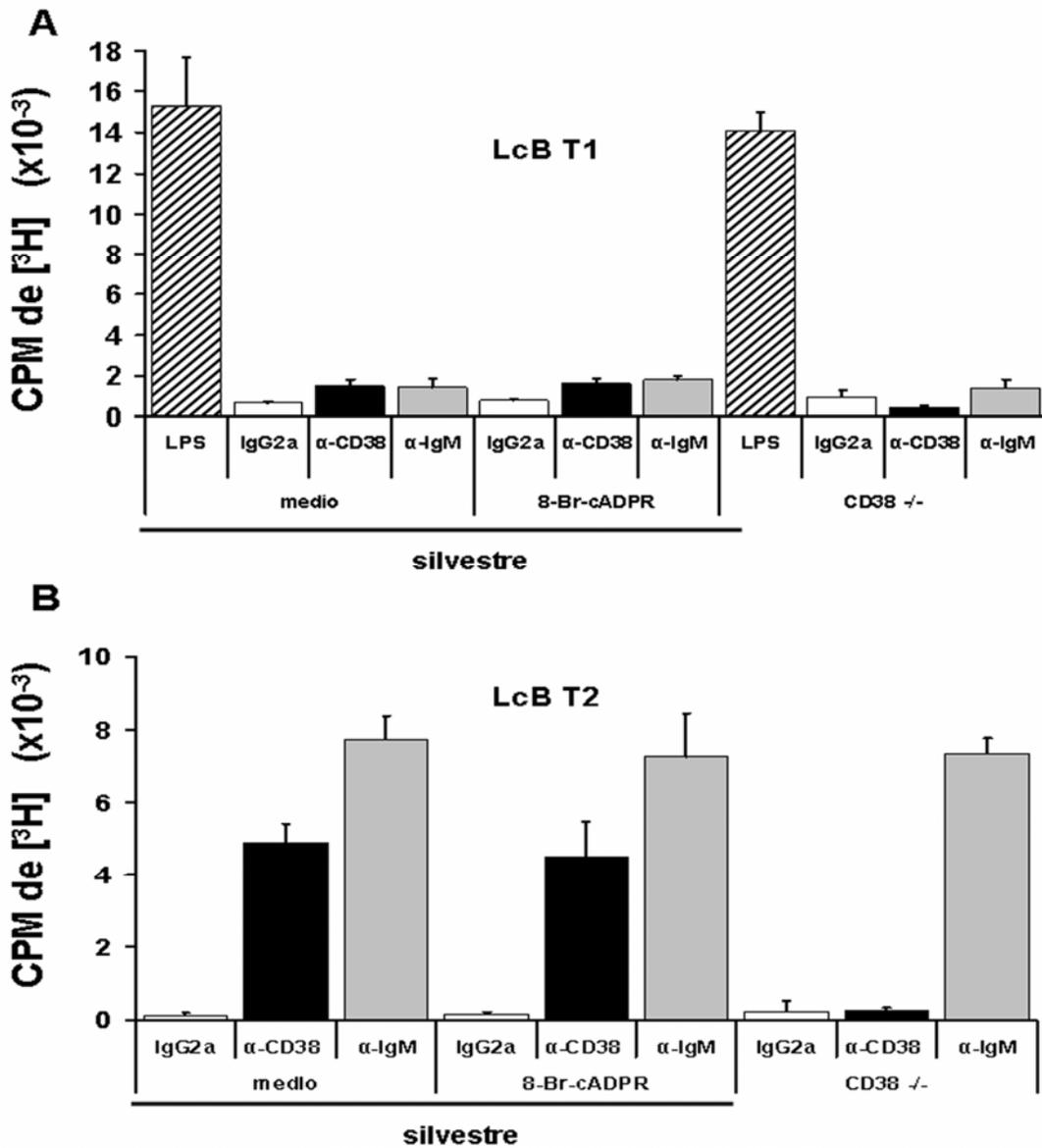


Figura 10. La actividad enzimática de CD38 no participa en la proliferación inducida en los LcB T2. (A) LcB T1 de ratones silvestres o deficientes en la expresión de CD38 fueron preincubados 30 minutos con o sin 8-Br-cADPR. Posteriormente, las células fueron estimuladas con IgG2a de ratas (barras blancas), anti-CD38 (barras negras), anti-IgM (barras grises) o LPS (barras con líneas diagonales), e incubados 48 horas a 37°C. (B) LcB T2 de ratones silvestres o deficientes en la expresión de CD38 fueron preincubados y estimulados como en el panel A, excepto por la adición del LPS. A continuación, cada pozo fue pulsado con timidina [³H] como en los experimentos anteriores. Los números a la izquierda indican la proliferación de cada subpoblación expresada en CPM de timidina [³H].

Anti-CD38 induce diferenciación de los LcB T2 esplénicos.

Los datos muestran que anti-CD38 es capaz de inducir la proliferación de los LcB T2, sin embargo, la población LcB T1 no presentó respuesta proliferativa ante el mismo estímulo. Así, el siguiente paso fue purificar las subpoblaciones inmaduras de LcB T1 y T2 de acuerdo a reportes previos²⁸ (ver material y métodos). Las células se obtuvieron de ratones de 6 a 8 semanas de edad de los siguientes fondos genéticos: C57BL/6 silvestre y C57BL/6 CD38^{-/-}, B6.129 silvestre, B6.129 Lyn^{-/-}, B6.129 Fyn^{-/-}, BALB/c silvestre y BALB/c XID (ver material y métodos). A continuación se evaluó la capacidad del anticuerpo monoclonal anti-CD38 para inducir diferenciación de estas subpoblaciones.

Subpoblaciones de LcB T1, T2 y M fueron cultivadas por 24 y 48 horas en la presencia de anti-CD38 (NIM-R5) o un control de isotipo. De acuerdo con el análisis en el tamaño y granularidad celular, así como la observación al microscopio de las placas de cultivo, los resultados muestran que un gran número de células T1 muere en el cultivo con el estímulo anti-CD38, en contraste los LcB T2 y M permanecen vivos y proliferan en el cultivo. De manera interesante, el estímulo anti-CD38 es capaz de inducir la diferenciación de los LcB T2 hacia un fenotipo de LcB maduro, proceso que es observado desde las 24 horas de incubación y es mas evidente a las 48 de cultivo (Figura 11A; Tabla I), este efecto se incrementó con la adición de la IL-4 (Figura 12A), aunque solamente en la población T2. En contraste, en los LcB T1 y M no se observa cambio de fenotipo alguno (Figura 12B; Tabla I), lo cual sugiere que la etapa de maduración es importante para que se lleve a cabo un efecto en la señal inducida por anti-CD38.

Es importante señalar que existe una población de LcB ZM que pueden estar mezclados con los LcB T2²⁷, por lo tanto, decidimos separar esta subpoblación para determinar si el estímulo anti-CD38 induce la proliferación de los LcB T2 sin que los LcB ZM afecten tal respuesta (Figura 13A), Los resultados muestran que los LcB ZM no afectan la diferenciación inducida por el anticuerpo anti-CD38 en los LcB T2 (Figura 13B). Por otra parte, al igual que en los ensayos de proliferación, decidimos analizar si la actividad enzimática de CD38 participa en la diferenciación promovida en la subpoblación de LcB T2. Los resultados muestran que la adición del inhibidor 8-Br-cADPR no afecta la diferenciación de los LcB T2 estimulados a través de CD38 o el BCR (Figura 11A). Para determinar si la concentración del estímulo podría inducir cambios en la diferenciación decidimos usar una concentración menor de anti-CD38, así como de anti-IgM. Los resultados mostraron que la diferenciación inducida en los LcB T2 disminuyó cuando se usó una menor dosis de anti-CD38, además, el efecto no es bloqueado por la presencia del inhibidor 8-Br-cADPR (Figura 11B). Estos resultados indican que la actividad como receptor de CD38 es independiente de la actividad enzimática, al menos para éstos ensayos en éstas células. En conjunto, los datos muestran que CD38 posee una función diferencial sobre las poblaciones inmaduras de LcB T1 y T2. De esta forma, el estímulo anti-CD38 induce la proliferación y la diferenciación de los LcB T2, mientras que estos efectos no son inducidos en los LcB T1.

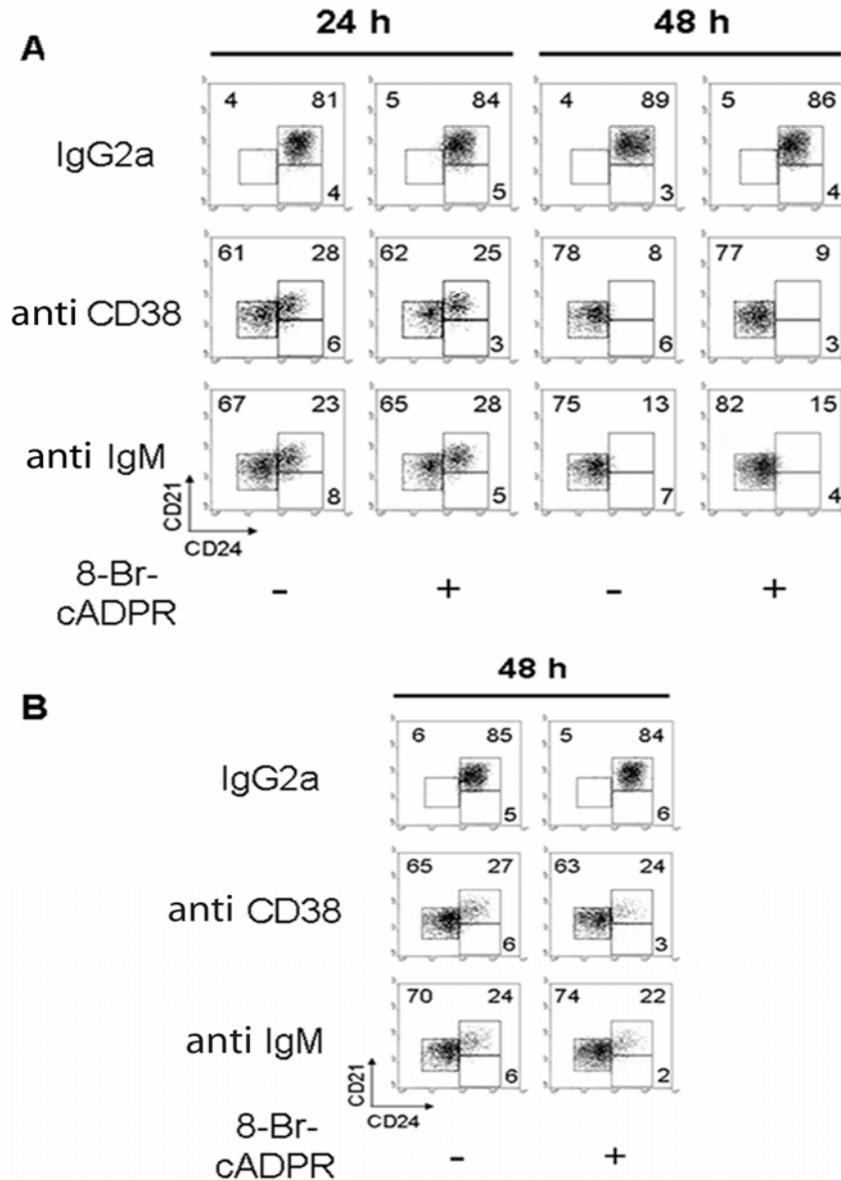


Figura 11. El estímulo con anti-CD38 promueve la diferenciación de los LcB T2. Linfocitos B T2 fueron purificados como se muestra en la figura 7. (A) Las células fueron incubadas 30 minutos en presencia o no de 8-Br-cADPR. Posteriormente, las células fueron estimuladas con IgG2a de rata (50 µg/ml), anti-CD38 (50 µg/ml) o anti-IgM (10 µg/ml). Después de 24 o 48 horas, las células fueron cosechadas y reteñidas (ver material y métodos) para evaluar su diferenciación de acuerdo a los marcadores de superficie CD21 y CD24. (B) Las células fueron preincubadas como en el panel A, estimuladas con IgG2a de rata o anti-CD38 (25 µg/ml) o anti-IgM (5 µg/ml), después de 48 horas fueron re-teñidas y analizadas como en el panel A. Los números indican el porcentaje de células para cada región. Cada gráfica es representativa de tres experimentos independientes con resultados similares.

Tabla I. Diferenciación de los LcB T1 y T2 ante el estímulo anti-CD38.

| Diferenciación | Estímulo | 24 horas | 48 horas |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| T1 a T2 | Medio | ND | 9.90 ± 4.67 |
| | Anti-CD38 | ND | 12.41 ± 5.54 |
| T2 a M | Medio | 10.66 ± 1.15 | 13.66 ± 4.04 |
| | IgG2a | 8.33 ± 2.0 | 9.33 ± 2.04 |
| | Anti-CD38 | 60.33 ± 2.52 | 77.66 ± 3.33* |

Linfocitos B T1 y T2 de ratones silvestres fueron purificados como se muestra en la figura 7, fueron incubados por 24 o 48 horas en medio, con IgG2a de rata o anti-CD38. La diferenciación es expresada por el porcentaje de LcB T2 o M en cada región (ver Figura 11). Los resultados muestran el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes donde el análisis estadístico utilizando la prueba t-Student fue: * $p < 0.01$ como se indica. (ND = No determinado).

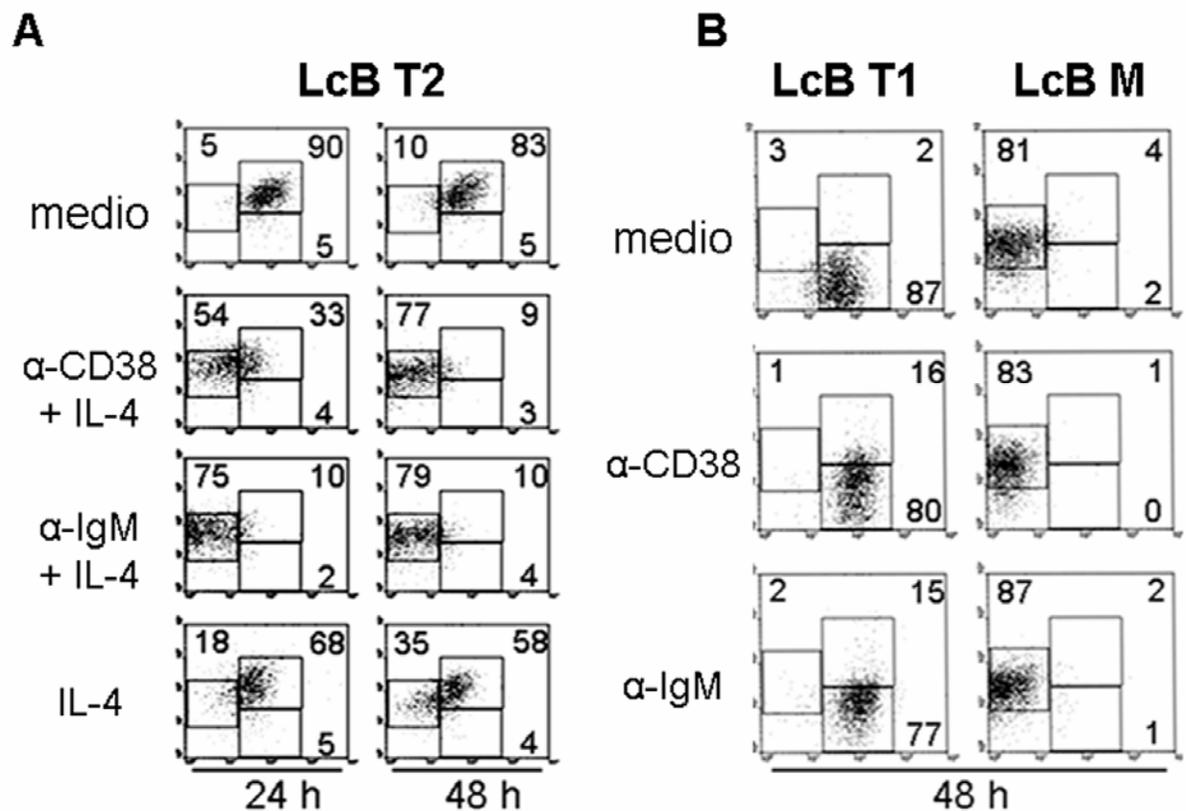


Figura 12. El estímulo anti-CD38 no es capaz de inducir la diferenciación de los LcB T1. Linfocitos B T1, T2 y M fueron purificados como se muestra en la Figura 7, posteriormente, fueron incubados por 24 y 48 horas con o sin la presencia de anti-CD38 o anti-IgM. Después de estos tiempos, las células fueron cosechadas y reteñidas para evaluar la diferenciación como se indica en la figura anterior. (A) Diferenciación de los LcB T2 con la adición de IL-4. (B) LcB T1 y M a las 48hrs de incubación con los estímulos indicados. Los números indican el porcentaje de células en cada región. Las gráficas son representativas de tres experimentos independientes con resultados similares

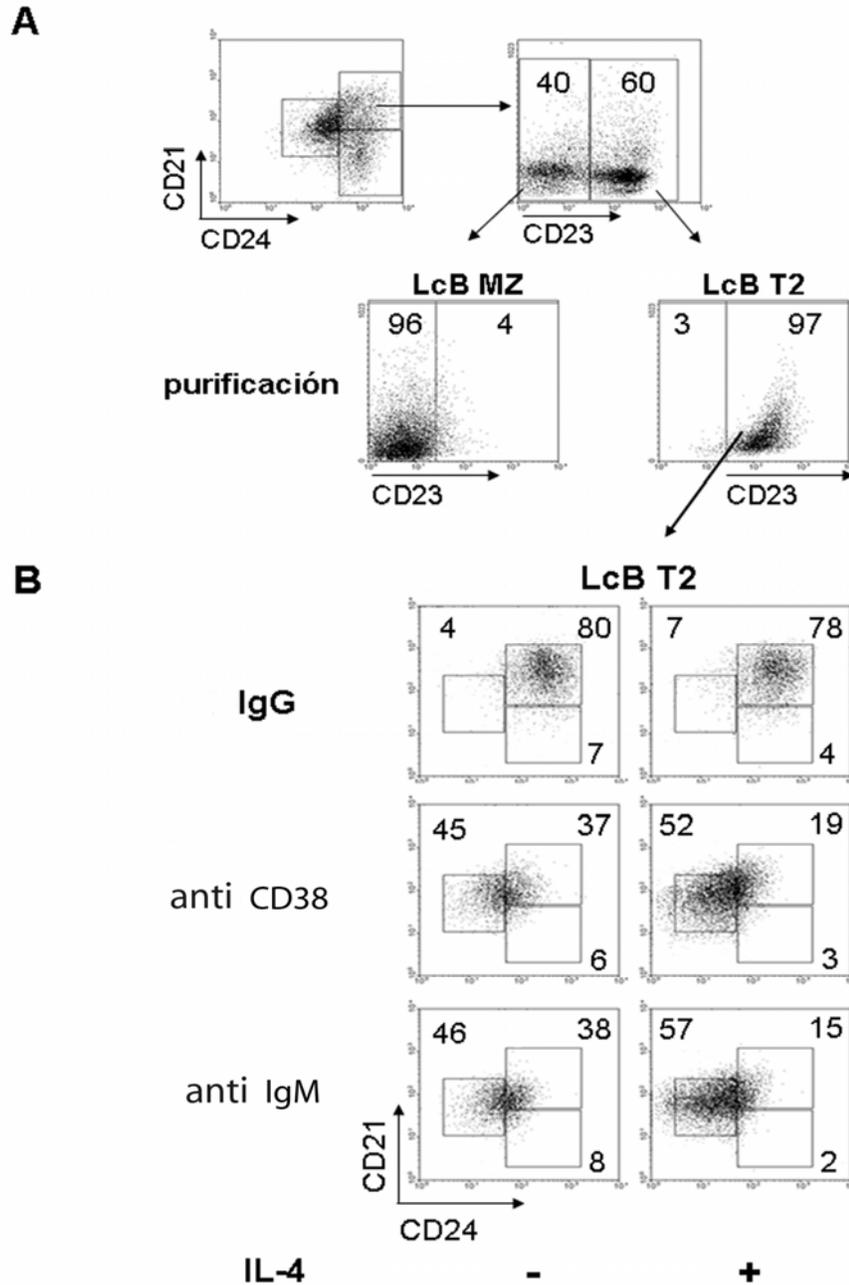


Figura 13. El estímulo anti-CD38 induce la diferenciación de una población muy pura LcB T2. Esplenocitos totales fueron teñidos con anti-B220, anti-CD21, anti-CD24 y anti-CD23, con el objetivo de separar LcB T2 de LcB MZ. (A) LcB T2 fueron separados con una pureza de 97%. Posteriormente fueron incubadas con IgG de rata, anti-CD38 y anti-IgM con o sin la adición de IL-4. (B) Después de 48 horas la células fueron re-teñidas (ver material y métodos) para evaluar la diferenciación de los LcB T2. Los números indican el número de LcB T2 que se diferencian en cada región. Cada gráfica es representativa de tres experimentos individuales diferentes.

El estímulo con anti-CD38 induce la apoptosis de la subpoblación de LcB T1.

Los resultados anteriores muestran claramente que CD38 induce respuestas diferentes en los LcB inmaduros T1 y T2. Los LcB T2 proliferan y se diferencian después del estímulo con el anticuerpo monoclonal anti-CD38 (NIM-R5), mientras que en los LcB T1 no se observa la misma respuesta. Reportes previos indican que el estímulo anti-CD38 es capaz de inducir la apoptosis en LcB totales inmaduros de humano (en médula ósea)⁷⁹. De esta manera, debido a que los LcB T1 no proliferan ni se diferencian tras la incubación con el estímulo anti-CD38 (figuras 9A y 10A), decidimos evaluar si existía apoptosis en estas células. LcB T1 fueron cultivados en presencia o ausencia del estímulo anti-CD38 por 24 horas. Los resultados muestran que un mayor número de LcB T1 se encuentran en el área Sub G0 del ciclo celular cuando se incuban las células con el estímulo anti-CD38 por 12 y 24 horas (Figura 14A), el porcentaje de LcB T1 en la región sub/G0 sugiere que estas células se encuentran en un proceso apoptótico (Figura 14B). El número de células apoptóticas disminuyó con la adición de IL-4; sin embargo, la IL-4 no fue suficiente para evitar la apoptosis de los LcB T1 inducida por el estímulo anti-CD38 (Figuras 14A-B y 15A). De la misma forma, se decidió analizar la apoptosis por medio de una tinción de yoduro de propidio y anexina V (Figura 15B), obteniéndose resultados semejantes. Además, decidimos realizar el mismo experimento en LcB T1 de ratones deficientes en la expresión de CD38 obteniendo resultados que indican que la apoptosis se debe a la presencia de CD38 y no es una muerte inespecífica (Figura 16). Estos resultados muestran que el estímulo anti-CD38 induce apoptosis de la población más inmadura de los LcB

esplénicos, semejante a lo reportado para estas células con otros estímulos como anti-IgM²⁸. Tal como se describió para los experimentos anteriores, la apoptosis inducida por CD38 no cambia por la presencia del inhibidor 8-Br-cADPR (Figura 15A), de esta manera se concluye que la actividad de receptor de CD38 es independiente de su actividad enzimática, al menos en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis analizadas en las subpoblaciones de LcB T1, T2 y M.

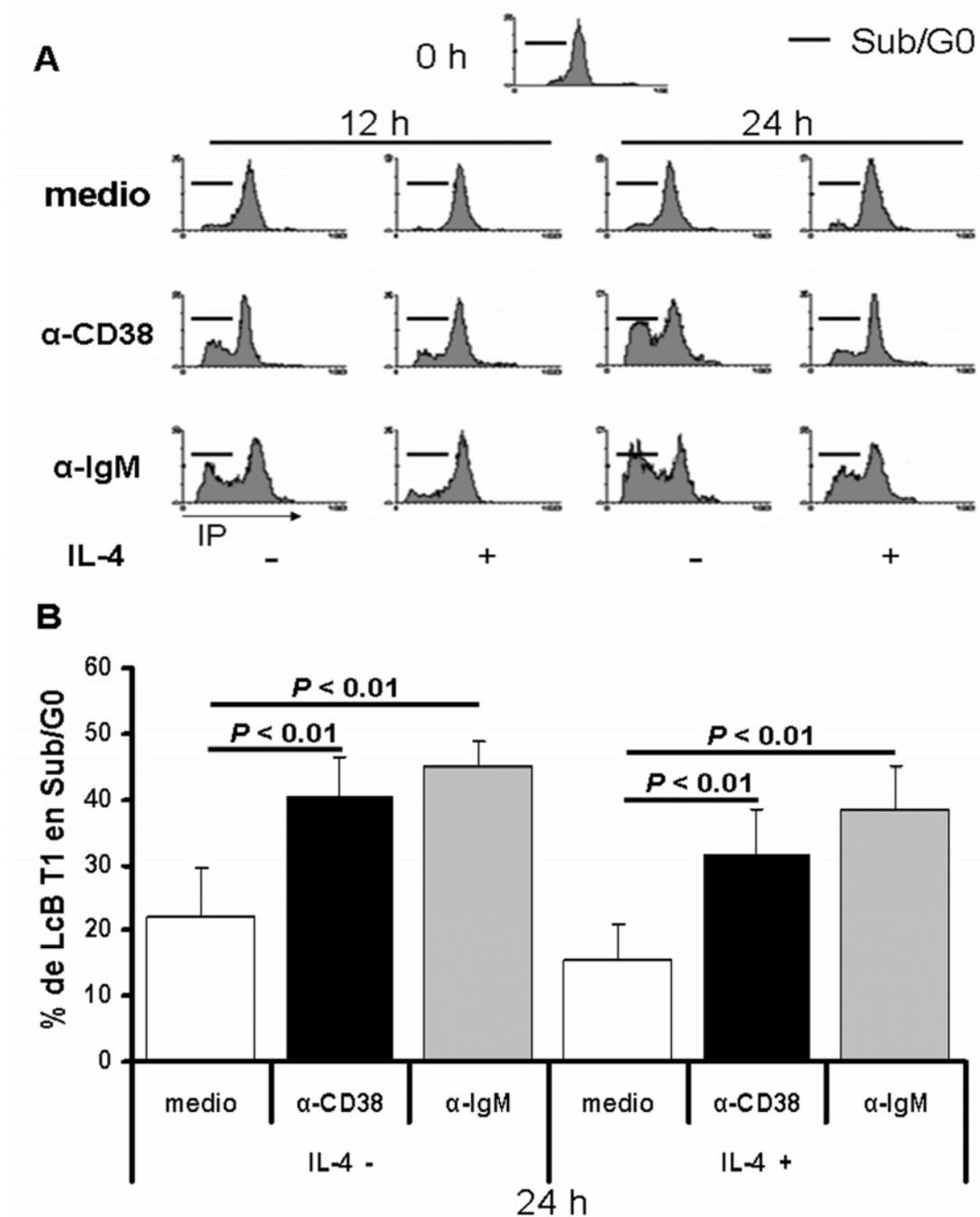


Figura 14. El estímulo con anti-CD38 induce la apoptosis de los LcB T1. LcB T1 fueron purificados como se muestra en la Figura 7. Posteriormente, fueron incubados 12 o 24 horas con anti-CD38 o anti-IgM, después fueron permeabilizadas y teñidos con yoduro de propidio. (A) Los histogramas muestran el contenido de DNA para cada condición. La línea negra muestra a los LcB T1 en la región Sub/G0. (B) Porcentaje de LcB T1 en la región SubG0 después de 24 horas de incubación con los estímulos indicados. Los resultados indican el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes donde el análisis estadístico t-Student fue $p < 0.01$ como se indica.

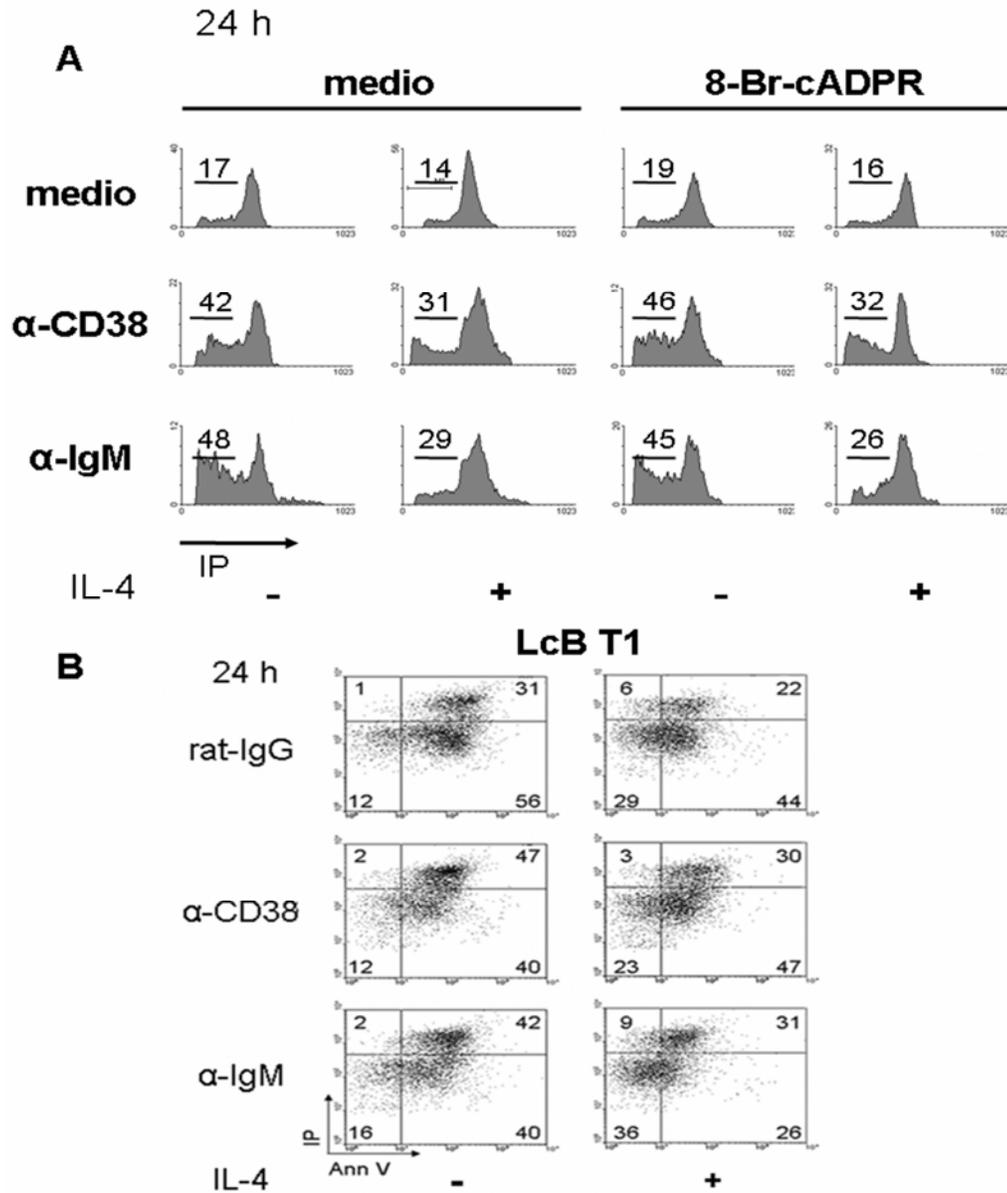


Figura 15. Apoptosis de los LcB T1 después del entrecruzamiento de CD38.

LcB T1 fueron purificados como se muestra en la figura 7. (A) Las células fueron preincubadas por 30 minutos con o sin la presencia de 8-Br-cADPR. Posteriormente, fueron estimuladas con IgG2a de rata, anti-CD38 o anti-IgM y 24 horas después fueron permeabilizadas y teñidas con yoduro de propidio. Los histogramas muestran el contenido DNA para cada condición, la región Sub/G0 es indicada por la línea negra. Los números indican el porcentaje de LcB T1 en la región Sub/G0. (B) Los LcB T1 fueron incubados y activados como en el panel A, posteriormente fueron cosechados y teñidos con yoduro de propidio y anexina V para analizar la apoptosis en cada condición. Los números indican el porcentaje de LcB T1 en cada región. Las gráficas son representativas de al menos tres experimentos independientes con resultados similares.

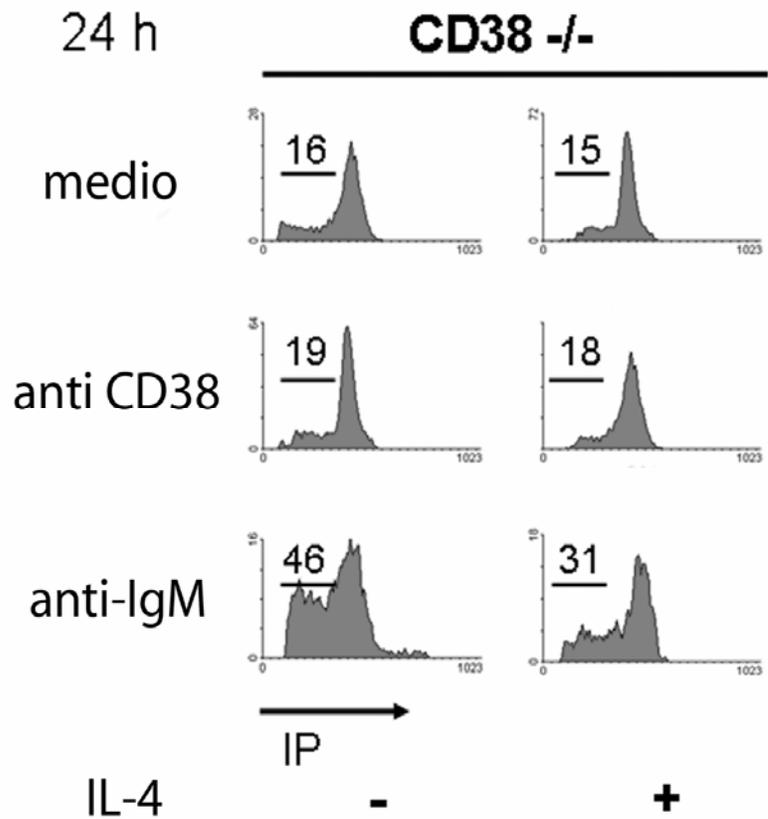


Figura 16. La apoptosis de los LcB T1 es promovida por el estímulo anti-CD38. LcB T1 de ratones deficientes en la expresión de CD38 fueron purificados como se muestra en la figura 7. Las células fueron estimuladas con anti-CD38 o anti-IgM con o sin la adición de IL-4. Después de 24 horas Los LcB T1 fueron permeabilizados y teñidos con yoduro de propidio. Los histogramas muestran el contenido DNA para cada condición, la región Sub/G0 es indicada por la línea negra. Los números indican el porcentaje de LcB T1 en la región Sub/G0.

El estímulo con anti-CD38 requiere de las moléculas de señalización Lyn, Fyn, PI3K y Erk para inducir la proliferación de los LB T2.

Diversos artículos han tratado de describir la vía de señalización de CD38^{80,90,95,96}. Sin embargo, el mecanismo completo aun no se conoce, por esta razón decidimos analizar las moléculas que participan en la proliferación inducida por CD38. Para ello, obtuvimos LcB T2 purificados de ratones silvestres o deficientes en la expresión de las moléculas Lyn o Fyn. Además, LcB T2 de ratones silvestres fueron incubados en presencia de drogas que inhiben la activación de PI3K o Erk (LY294002 o PD98059, respectivamente). Los resultados mostraron que la proliferación inducida por CD38 fue menos efectiva en LcB T2 de ratones deficientes en la expresión de Lyn o Fyn (Figura 17A), Además, la incubación de LcB T2 de ratones silvestres con las drogas señaladas también inhiben la proliferación inducida por el estímulo anti-CD38 (Figura 17B). Estos resultados correlacionan con reportes previos que indican la importancia de estas moléculas en la maduración de los LcB⁸⁰. Así mismo, nuestros datos muestran que tanto Lyn, Fyn, PI3K y la proteína cinasa Erk son activadas tras el entrecruzamiento de CD38 y además son requeridas para inducir la proliferación de LcB T2 purificados.

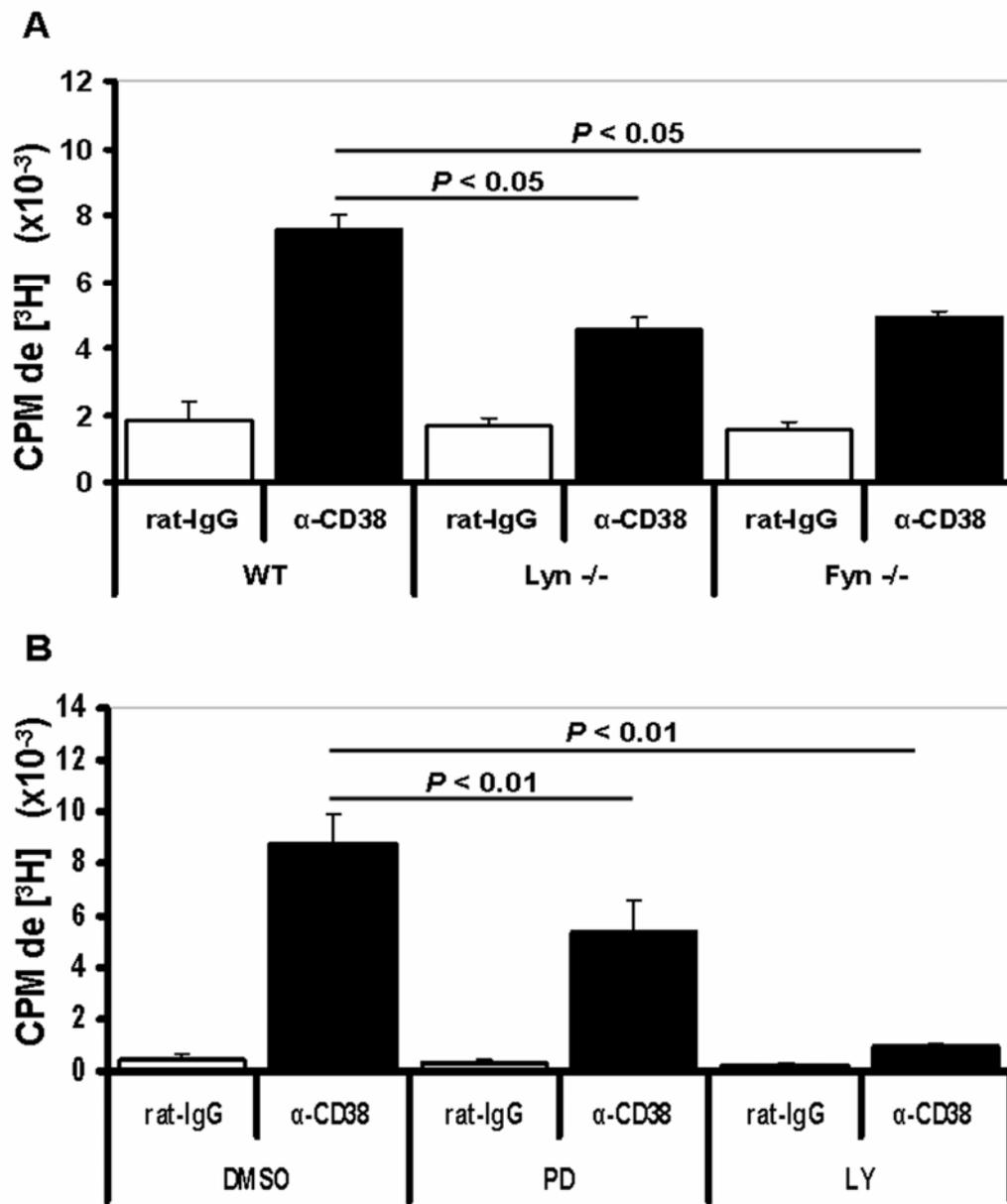


Figura 17. La vía de señalización de CD38 requiere a las moléculas Lyn, Fyn, PI3K y Erk para inducir la proliferación de los LcB T2. (A) LcB T2 obtenidos y purificados de ratones silvestres o deficientes en la expresión de Lyn y Fyn fueron estimulados 48 horas con IgG de rata (barras blancas) o anti-CD38 (barras negras). (B) LcB T2 purificados de ratones silvestres fueron preincubados 30 minutos con DMSO, LY294002 (LY) o PD98059 (PD). Las células en presencia de las drogas fueron estimuladas como se indicó en el panel A. Cada pozo fue pulsado 8 horas antes de su cosecha con 1 μ Ci de timidina [³H]. Los resultados indican el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes con resultados semejantes utilizando la prueba de t-Student donde $p < 0.05$ o $p < 0.01$ como se indica.

CD38 requiere de las moléculas Lyn, Fyn, Btk, PI3K y Erk, pero no PLC- γ 2 para promover la diferenciación de los LcB T2.

Se ha sugerido que el estímulo anti-CD38 requiere diversas moléculas para inducir la proliferación de los LcB, pero no de la molécula PLC- γ 2 una molécula determinante en la vía de señalización usada por el BCR⁹⁰. Con el objetivo de analizar si las moléculas mencionadas en la sección anterior participan en la maduración de los LcB T2 en presencia de anti-CD38, estas células fueron purificadas e incubadas en presencia de anti-CD38 o anti-IgM. Los resultados muestran que los LcB T2 provenientes de ratones deficientes en la expresión de las moléculas CD38, Btk, Lyn o Fyn no se diferencian tras la incubación con anti-CD38 (Figura 18A; Tabla II). Además, la adición de las drogas LY294002 o PD98059 a los cultivos evitó que LcB T2 de ratones silvestres se diferenciaron hacia un fenotipo de LcB maduro. Por otra parte, cuando las células se incubaron en presencia de un inhibidor específico de PLC- γ 2 (la droga U-73122), no se observó ningún efecto en la diferenciación inducida por anti-CD38, no obstante, la presencia del inhibidor evitó casi por completo la diferenciación inducida por el estímulo anti-IgM (Figura 18B; Tabla III). Estos datos sugieren que CD38 requiere a estas moléculas para promover la maduración de los LcB T2, además, indican que CD38 comparte algunas de las moléculas de señalización usadas por el BCR pero no necesariamente las mismas, así, parece que la molécula PLC- γ 2 no es requerida por CD38 para inducir la maduración de estas células, dato que correlaciona con resultados obtenidos anteriormente por nuestro laboratorio⁹⁰.

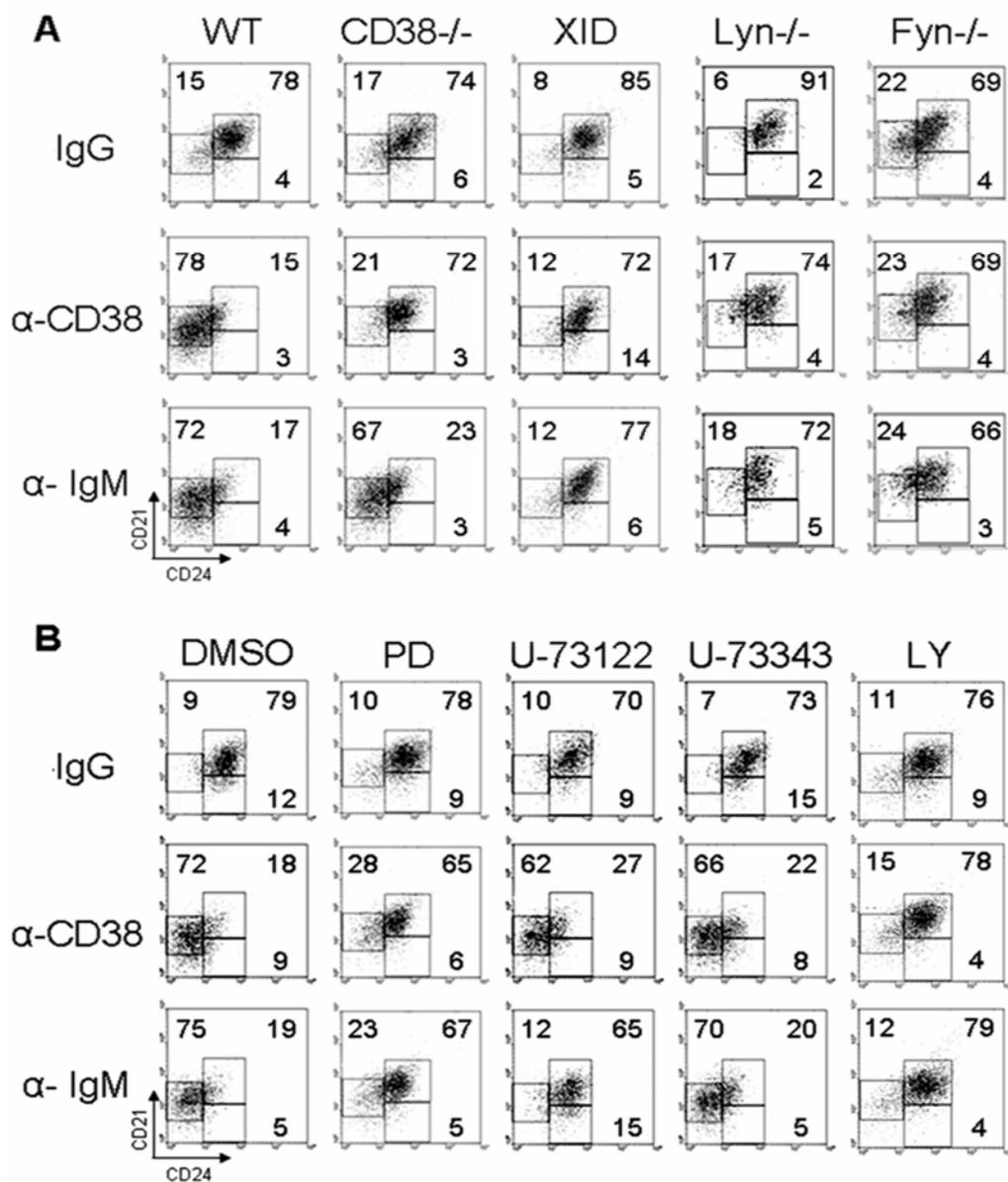


Figura 18. CD38 requiere a Lyn, Fyn, Btk, PI3K, y Erk, pero no a la PLC- γ 2 para promover diferenciación de los LcB T2. (A) LcB T2 purificados de ratones silvestres o deficientes en la expresión de las moléculas CD38, Lyn, Fyn o Btk (Xid) fueron estimulados con IgG de rata, anti-CD38 o anti-IgM por 48 horas. (B) LcB T2 purificados de ratones silvestres fueron preincubados 30 minutos con DMSO o las drogas PD98059, U73122, U73343 o LY294002. Las células en presencia de las drogas fueron estimuladas como se indicó en el panel A. Después, estas fueron cosechadas y reteñidas (ver material y métodos) para analizar su diferenciación. Los números indican el porcentaje de células en cada región. Esta figura es representativa de tres experimentos con resultados similares.

Tabla II. Arresto en la diferenciación de los LcB T2 en ratones con defectos en la señalización.

| Estímulo | Ratón | | | | |
|-----------|--------------|---------------------|---------------|--------------------|--------------------|
| | WT | CD38 ^{-/-} | XID | Lyn ^{-/-} | Fyn ^{-/-} |
| IgG | 13.61 ± 4.01 | 13.01 ± 1.10 | 10.33 ± 2.08 | 8.03 ± 2.10 | 13.33 ± 4.04 |
| Anti-CD38 | 74.83 ± 3.78 | 19.11 ± 2.01* | 13.33 ± 1.52* | 18.10 ± 1.0* | 20.66 ± 4.6* |

LcB T2 purificados de ratones silvestres o deficientes en la expresión de las moléculas CD38, Btk (XID), Lyn o Fyn fueron estimulados por 48 horas con anti-CD38. La diferenciación de los LcB T2 hacia LcB M inducida por el estímulo con anti-CD38 se indica como el porcentaje de células en la región de LcB M. Los resultados muestran el promedio y desviación estándar de tres experimentos donde el análisis estadístico t-Student fue * p<0.01 como se indica, comparando la diferenciación inducida por anti-CD38 en cada cepa de ratones estudiadas.

Tabla III. Inhibición de la diferenciación inducida por anti-CD38 por diferentes drogas que interfieren con la señalización intracelular.

| Estímulo | Inhibidor | | | | |
|-----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|
| | DMSO | PD98059 | U-73122 | U-73343 | LY294002 |
| IgG | 10.09 ± 1.73 | 8.66 ± 3.03 | 10.66 ± 1.01 | 9.33 ± 1.52 | 10.33 ± 1.05 |
| Anti-CD38 | 73.31 ± 5.0 | 23.33 ± 4.55* | 66.43 ± 3.78 | 68.66 ± 3.5 | 16.66 ± 2.1* |

LcB T2 purificados de ratones silvestres fueron preincubados 30 minutos con DMSO o los inhibidores PD98059, U73122, U73343 o LY294002. Después de la incubación fueron estimuladas con anti-CD38. La diferenciación inducida por anti-CD38 se muestra como el porcentaje de células en la región de células B maduras. Los resultados indican el promedio y desviación estándar de tres experimentos representativos donde el análisis t-Student fue * p<0.01 como se indica, comparando la diferenciación inducida por anti-CD38 en presencia de diferentes drogas o el vehículo.

El estímulo con anti-CD38 induce la fosforilación de Erk en los LcB T2.

Con el objetivo de analizar a fondo la participación de la cinasa Erk ante el estímulo anti-CD38, decidimos evaluar la fosforilación de esta molécula por citometría de flujo y ensayos tipo “Western blot”. Nuestros resultados mostraron que el entrecruzamiento de CD38 induce la fosforilación de Erk en linfocitos B totales de ratones silvestres, sin embargo, no se observó la fosforilación en las células de ratones deficientes en la expresión de CD38 (Figure 19A). La adición de un inhibidor específico de Erk (la droga PD98059) bloqueó por completo la fosforilación inducida por anti-CD38 (Figure 19A), lo cual sugiere que Erk se activa en los LcB T2 vía CD38. Además, el ensayo tipo “Western blot” mostró que el entrecruzamiento de CD38 induce fosforilación de Erk a los 1, 5 o 10 minutos en LcB T2 purificados de ratones silvestres (Figura 19B). Por otra parte, la adición de las drogas LY294002 o PD98059 al cultivo evitó la fosforilación de Erk ante el mismo estímulo (Figura 19B). De esta forma, nuestros datos sugieren que CD38 requiere a la cinasa Erk para inducir proliferación y diferenciación de los LcB T2, además, sugieren que la activación de Erk se lleva a cabo después de la activación de PI3K en la vía de señalización de CD38 en estas células.

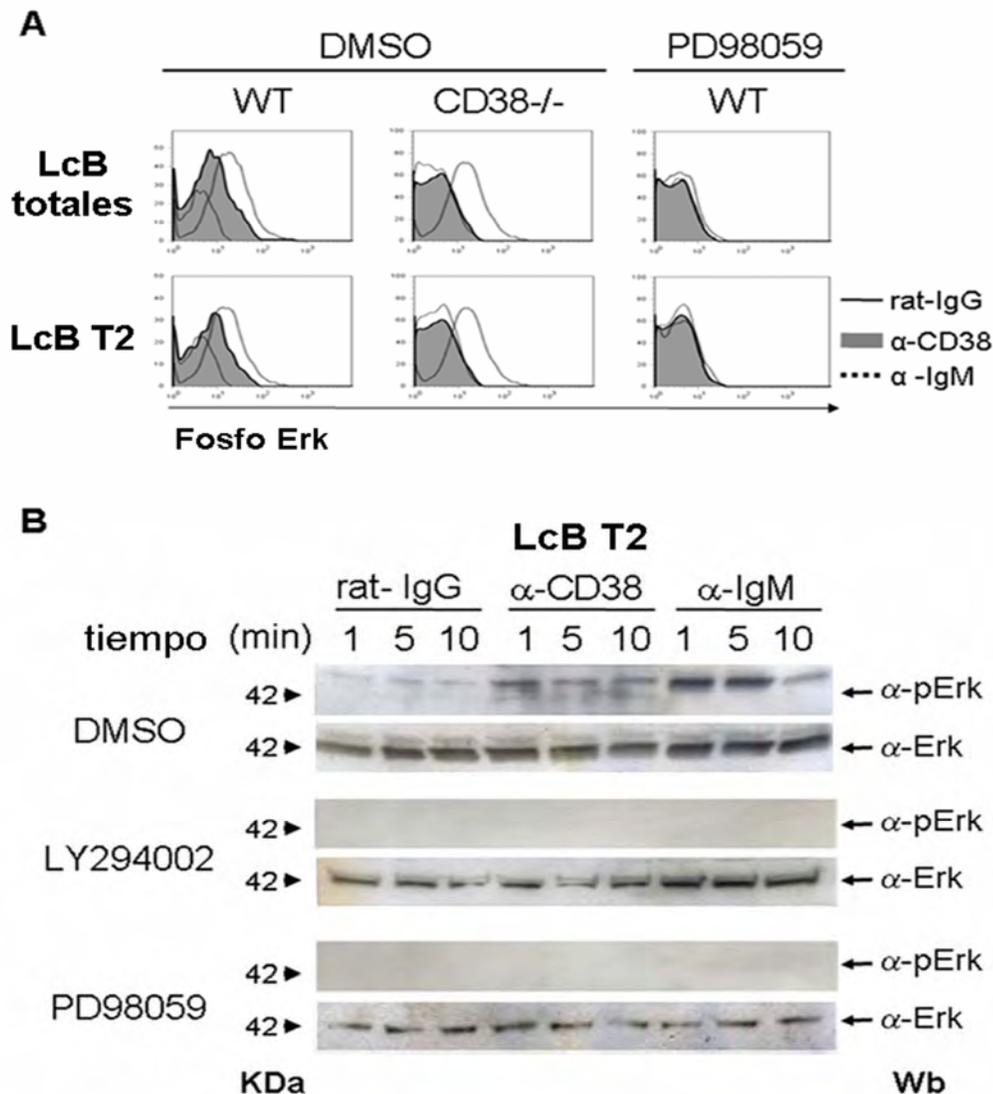


Figura 19. El entrecruzamiento de CD38 en los LcB T2 induce la fosforilación de la cinasa Erk y este efecto requiere de la activación de la PI3-K. Esplenocitos totales de ratones silvestres o deficientes en la expresión de CD38 fueron preincubados con DMSO o PD98059 por 30 minutos. Después de la incubación, las células fueron estimuladas 10 minutos con IgG de rata (línea negra), anti-CD38 (histograma gris) o anti-IgM (línea punteada). Después de la activación las células fueron inmediatamente teñidas para observar la expresión de B220, CD21, CD24 y pErk. (A) La fosforilación de Erk fue analizada en LcB totales o en la región de LcB T2. (B) LcB T2 de ratones silvestres fueron purificados y preincubados con DMSO, PD98059 o LY294002 por 30 minutos. Después de la incubación las células fueron estimuladas 1, 5 o 10 minutos con IgG de rata, anti-CD38 o anti-IgM. La fosforilación de Erk se muestra para cada una de las condiciones.

DISCUSIÓN

En el proceso de maduración, los LcB necesitan la expresión y activación de moléculas en cada etapa de maduración¹, por lo tanto, en la ausencia de estas moléculas, la maduración disminuye o desaparece^{1,21}. Diversos estudios han descrito que solo una pequeña fracción de las células B producidas en médula ósea logran migrar hacia los órganos linfoides secundarios donde tratarán de alcanzar la madurez, así, de los cerca de 20 millones de células B que se producen diariamente, solo el 15-20% llegan al bazo^{21,26,30}. Se ha sugerido que muchas de estas células mueren en el torrente sanguíneo o son eliminadas por un proceso de selección negativa^{20,22,24}, de esta forma, solo las células que escapan de esta selección logran avanzar hacia las siguientes etapas de desarrollo. En relación a éste proceso, la selección positiva ha sido probada en el caso de los LcB ZM o B1^{39,97}. Aunque los procesos de maduración de los LcB han sido ampliamente explorados, aún quedan muchas dudas por resolver en cuanto a los procesos de diferenciación y maduración de estas células.

La molécula CD38 se expresa en la membrana de los LcB desde etapas tempranas de su maduración en médula ósea⁸¹, además, diversos estudios han demostrado que la estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD38 induce diferentes efectos biológicos en los LcB dependiendo de la etapa de maduración en que se encuentren la células. Algunos de estos efectos son: proliferación, activación celular y movilización de calcio intracelular en LcB maduros^{69,73-75} o apoptosis en LcB inmaduros.^{76,79} A pesar de estas evidencias, no se han realizado

estudios detallados de la participación de CD38 en alguna etapa particular de la ontogenia de los linfocitos B. En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo fué determinar cual es la función de CD38 en la diferenciación de los linfocitos B inmaduros esplénicos en las etapas de maduración denominadas T1, T2 y M en ratones de diferentes cepas, incluidos algunos que tienen deficiencias en la expresión de moléculas de señalización importantes para la maduración de los linfocitos B. De manera interesante, uno de los primeros hallazgos indica que los porcentajes de LcB T1 se encuentran elevados, mientras que los LcB T2 están disminuidos en el ratón deficiente en la expresión de CD38, con respecto a su contraparte en el ratón silvestre (Figura 6A). Este dato sugiere que la presencia de CD38 podría favorecer la maduración de las subpoblaciones inmaduras de LcB en periferia. Distintos receptores de superficie como el BCR y moléculas como Lyn, Fyn, PLC- γ 2, VAV, BLNK y NF- κ β ⁹⁸ son necesarias para que el LcB T1 madure hacia la etapa de linfocito B folicular, nuestros datos sugieren que CD38 podría ser parte de estas moléculas.

Los reportes previos muestran que CD38 se encuentra presente en los LcB totales de bazo⁸¹. Este trabajo muestra que la expresión de CD38 en cada etapa de la maduración de los LcB T1, T2 y M es diferente. La población de LcB T2 tiene una mayor expresión de CD38 y otras moléculas que indican activación celular (Figura 6C). Estudios realizados en los LcB T2 indican que esta población contiene una gran cantidad de ciclina D2 que correlaciona con una respuesta proliferativa mayor que la de los LcB T1. Además, una gran cantidad de estas células (T2) se encuentra en la fase del ciclo celular G2/M, sugiriendo que efectivamente tienen un fenotipo de activación mayor al de los LcB T1, por otra

parte, se ha demostrado que los LcB T2 pero no los T1 proliferan ante la estimulación con el factor de crecimiento de la célula B, denominado BAFF (BLyS, TALL-1 o THANK)⁹⁹. Reportes más recientes muestran que los LcB T2 proliferan y se diferencian ante estímulos a través del BCR, mientras que los LcB T1 no responden y por el contrario mueren por apoptosis^{24,28}. De este modo, es evidente que la maduración de estas poblaciones está relacionado con la etapa en la que se encuentra la célula y el tipo de estímulo. Nuestros datos demuestran que el anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38) es capaz de realizar efectos diferentes en las poblaciones inmaduras de los LcB en bazo, CD38 induce la proliferación y diferenciación solo de la subpoblación T2 hacia un fenotipo de LcB maduro (Figuras 9, 11; Tabla I), mientras que induce apoptosis de los LcB T1 (Figura 14). Ambos datos correlacionan con reportes previos que indican que CD38 es capaz de inducir proliferación⁷³⁻⁷⁵ o apoptosis^{76,79} en las células B. De este modo, CD38 podría tener una función regulando la maduración de estas poblaciones inmaduras de linfocitos B de manera semejante a la función de otras moléculas como el BCR o el factor BAFF.

Con respecto al mecanismo que usa CD38 para activar a los LcB, diversos grupos han sugerido que CD38 podría recibir coestímulos provenientes del BCR⁹³ o algunas otras moléculas como CD19⁹² para poder iniciar la señalización intracelular, aunque no se ha podido establecer si existe algún tipo de colaboración entre estas moléculas. Por otra parte, la ruta de señalización activada por el entrecruzamiento de CD38 ha sido parcialmente descrita en los LcB y LcT^{80,90,92,95,96,100}, por lo tanto, el siguiente paso fue analizar moléculas de señalización activadas en los LcB T2 por el estímulo anti-CD38. Nuestros datos

muestran que los LcB T2 provenientes de ratones con deficiencias en la expresión de CD38, Btk (Xid), Lyn o Fyn presentaron alteraciones en la proliferación y diferenciación inducida por el estímulo anti-CD38. Además, LcB T2 de ratones silvestres también tuvieron defectos en la maduración cuando se adicionaron al cultivo drogas que inhiben la actividad de las moléculas de señalización PI3K o Erk, sin embargo, no se observaron cambios en la proliferación o diferenciación de los LcB T2 ante la inhibición de la PLC- γ 2 (Figuras 17A-B y 18A-B).

De esta manera, nuestros datos indican que el entrecruzamiento de CD38 activa a moléculas importantes en el desarrollo de los LcB, principalmente en la transición de los LcB T2 hacia un fenotipo de LcB maduro¹⁰¹⁻¹⁰⁷. Además, CD38 induce proliferación y diferenciación de los LcB T2 de manera aparentemente semejante a lo que sucede con estímulos a través del BCR. A pesar de ello, la vía de señalización activada por CD38 no es precisamente la misma que se activa por el entrecruzamiento del BCR, tal como lo sugieren trabajos recientes⁹⁰ y como lo indica la independencia de la PLC- γ 2 en la maduración de los LcB T2 en este trabajo, por lo que su función puede ser diferente en la maduración de estas células. Un hallazgo adicional, es que los ensayos muestran que la cinasa activada por mitógeno Erk es requerida para la proliferación y maduración de los LcB T2 ante el estímulo anti-CD38 (Figura 19A) en concordancia con reportes previos⁹². Además, parece ser que Erk se activa después que lo hace la PI3K (Figura 19B) tal como ha ocurrido en otros modelos¹⁰⁸. Así, en conjunto, nuestros datos muestran que CD38 activa diferentes vías de señalización en los LcB dependiendo de la etapa de maduración en la que se encuentren estas células. La

Figura 20 muestra un esquema que resume las moléculas descritas en este trabajo y la vía de señalización activada por CD38 en los LcB T2.

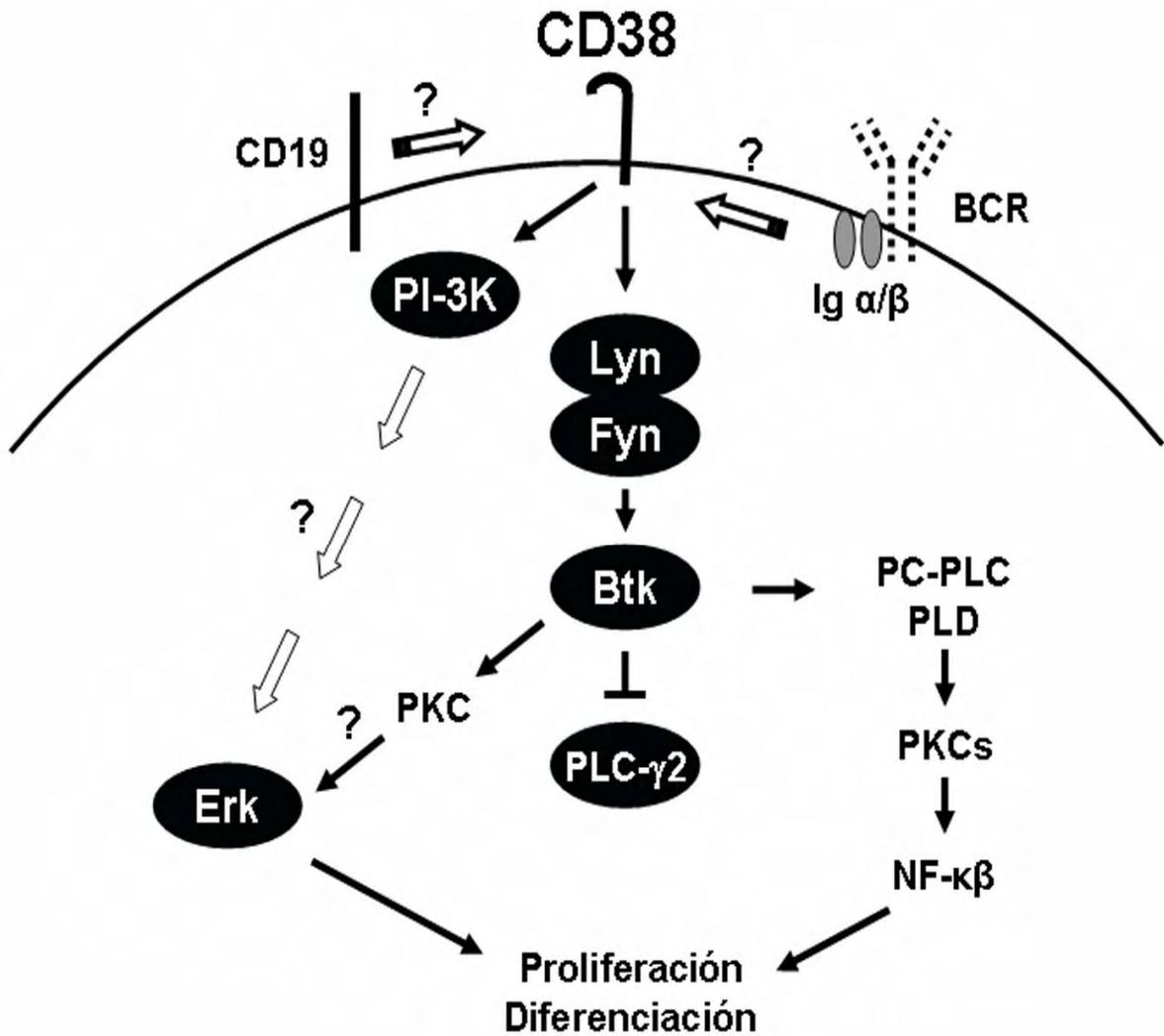


Figura 20. Vía de señalización activada por CD38 para inducir proliferación y diferenciación de los LcB T2. El anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38) induce la activación de diversas moléculas de señalización intracelular, en círculos negros se indican las moléculas analizadas en este estudio. En el caso de Lyn, Fyn y Btk se usaron células de ratones deficientes en la expresión de dichas moléculas. Para las determinar a las moléculas PI-3K, Erk y PLC- γ 2 se usaron diferentes inhibidores en células de ratones silvestres. Los signos de interrogación sugieren la ruta de activación que sigue cada molécula, algunas de ellas, sugeridas por diversos autores pero que aún no se han identificado en estas células.

CONCLUSIONES

CD38 tiene un efecto diferencial en la maduración de las subpoblaciones de linfocitos B inmaduros esplénicos murinos. El estímulo anti-CD38 es capaz de inducir proliferación y diferenciación de los LcB T2 hacia un fenotipo de linfocito B maduro. En contraste, promueve la apoptosis de la población más inmadura de LcB de bazo (T1). Estos efectos son independientes de la actividad enzimática que también posee CD38.

CD38 es capaz de activar moléculas de señalización intracelular como son Btk, PI-3K, Lyn, Fyn y la cinasa Erk, pero no a la PLC- γ 2 para promover la proliferación y maduración de los LcB T2.

De ésta manera, CD38 realiza una importante función durante la ontogenia de estas células, participando en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis de los LcB.

PERSPECTIVAS

Aún cuando se ha determinado que CD38 tiene una función importante en la maduración de los LcB y otras células, es necesario elucidar la forma en que esta molécula inicia los eventos de señalización intracelular, es decir, determinar si existe una colaboración con otros receptores de superficie como el BCR o CD19 y como es que se efectúa este vínculo. Otro aspecto fundamental para entender el mecanismo de activación celular a través de CD38 es caracterizar su ligando natural, al respecto diversos grupos han sugerido que CD31⁸⁵, el ácido hialurónico⁸⁶ o las células dendríticas⁸⁷ podrían activar a esta molécula “*in vivo*”. En este trabajo, se abordó principalmente el efecto del estímulo NIM-R5 (anti-CD38) en LcB T2 para analizar la maduración de estas células, así como la activación intracelular. El determinar donde se encuentra el ligando, nos permitiría saber que células o factores contribuyen a la maduración de estas células de forma natural.

Otro aspecto interesante, es investigar la participación de CD38 en la apoptosis inducida a los LcB T1. Además, averiguar cuales son las moléculas activadas en este proceso de muerte en estas poblaciones y así determinar si CD38 tiene una función reguladora de maduración o muerte celular en la ontogenia de los linfocitos B, de acuerdo a la etapa en que se encuentren.

REFERENCIAS

1. Hardy RR and Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. *Ann Rev Immunol.* Vol. 19;595-621.
2. Sun X-H and Baltimore D. 1991. An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell.* 64:459-470.
3. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell.* 79:875-884.
4. Seet CS, Brumbaugh RL, Kee BL. 2004. Early B Cell Factor Promotes B Lymphopoiesis with Reduced Interleukin 7 Responsiveness in the Absence of E2A. *J Exp Med.* Vol. 199; 1689-1700.
5. Hagman J and Lukin K. 2006. Transcription factors drive B cell development. *Current Opinion in Immunology.* 18:127-134.
6. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science.* 238:1079-1087.
7. Rolink AG, Winkler T, Melchers F, Andersson J. 2000. Precursor B Cell Receptor-dependent B Cell Proliferation and Differentiation Does Not Require the Bone Marrow or Fetal Liver Environment. *Journal of Experimental Medicine.* Vol. 191; 23-32.
8. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell.* 59:1035-1048.
9. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* 248:1517-1523.
10. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. 1996. Surrogate light chain in B cell development. *Adv Immunol.* 63:1-41.
11. Melchers F, Karasuyama H, Haasner D, et al. 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunology Today.* 14:60-68.
12. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol.* 1:379-385.
13. Meffre E and Nussenzweig MC. 2002. Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *PNAS.* 99:11334-11339.
14. Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igα/β heterodimer. *Cell.* 117:787-800.
15. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell.* 90:1073-1083.
16. Reth M, Petrac E, Wiese P, Lobel L, Alt FW. 1987. Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains. *EMBO.* 6:3299-3305.
17. Kitamura D and Rajewsky K. 1992. Targeted disruption of μ chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature.* 356:154-156.

18. Ohnishi K and Melchers F. 2003. The nonimmunoglobulin portion of $\lambda 5$ mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol.* 4:849-856.
19. Heltemes LM and Manser T. 2002. Level of B Cell Antigen Receptor Surface Expression Influences Both Positive and Negative Selection of B Cells During Primary Development. *J Immunol.* Vol. 169; 1283-1292.
20. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. 2001. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Op Immunol.* 13:202-207.
21. Osmond DG. 1993. The turnover of B-cell populations. *Immunology Today.* 14:34-37.
22. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, et al. 1995. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Op Immunol.* 7:214-227.
23. Norvell A, Mandik L, Monroe JG. 1995. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *Journal of Immunology.* 154:4404-4413.
24. Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med.* 181:2129-2140.
25. Allman DM, Ferguson SE, Cancro MP. 1992. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen(hi) and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol.* 149:2533-2540.
26. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. 1993. Peripheral B cell maturation: II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol.* 151:4431-4444.
27. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 190:75-89.
28. Su TT and Rawlings DJ. 2002. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol.* 168:2101-2110.
29. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science.* 293:2111-2114.
30. Rolink AG, Andersson J and Melchers F. 1998. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur. J Immunol.* Vol. 28; 3738-3748.
31. Allman D, Lindsley RC, Demuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. 2001. Resolution of three nonproliferate immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol.* 167:6834-6840.
32. Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med.* 181:2129-2140.
33. Petro JB, Gerstein RM, Lowe J, Carter RS, Shinnars N, Khan WN. 2002. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 277:48009-48019.
34. Cariappa A, Boboila C, Moran ST, Liu H, Shi HN, Pillai S. 2007. The Recirculating B Cell Pool Contains Two Functionally Distinct, Long-Lived, Posttransitional, Follicular B Cell Populations. *J Immunol.* Vol. 179; 2270-2281.

35. Lindsley RC, Thomas M, Srivastava B, Allman D. 2007. Generation of peripheral B cells occurs via two spatially and temporally distinct pathways. *Blood*. Vol. 109; 2521-2528.
36. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, et al. 2006. Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity*. 25:953-962.
37. Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*. 197:179-191.
38. Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. 1998. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today*. 19:480-485.
39. Martin F and Kearney JF. 2000. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*. 12:39-49.
40. Mebius RE, Nolte MA, Kraal G. 2004. Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol*. 24:449-464.
41. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. 2005. marginal zone B cells. *Annu Rev immunol*. Vol. 23; 161-196.
42. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*. 13:655-692.
43. Lanzavecchia A. 1985. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*. 314:537-539.
44. Bishop GA and Hostager BS. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 13:278-285.
45. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. 2004. CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. Vol. 22; 307-328.
46. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. 1991. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med*. 173:1165-1175.
47. Monroe JG. 2004. B-cell positive selection and peripheral homeostasis. *Immunol Rev*. Vol. 197; 5-9.
48. Sproul TW, Malapati S, Kim J, Pierce SK. 2000. Cutting Edge: B Cell Antigen Receptor Signaling Occurs Outside Lipid Rafts in Immature B Cells. *J Immunol*. Vol. 165; 6020-6023.
49. Kurosaki T. 1999. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Ann Rev Immunol*. 17:555-592.
50. Lowell CA and Soriano P. 1996. Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev*. Vol. 10; 1845-1857.
51. Texido G, Su Ih, Mecklenbrauker I, et al. 2000. The B-Cell-Specific src-Family Kinase Blk Is Dispensable for B-Cell Development and Activation. *Mol. Cell. Biol*. Vol. 20; 1227-1233.
52. Marshall AJ, Nihiro H, Yun TJ, Clark EA. 2000. Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C γ pathways. *Immunol Rev* Vol. 176; 30-46.
53. Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. 1998. BLNK: a Central Linker Protein in B Cell Activation. *Immunity*. 9:93-103.
54. Hashimoto S, Iwamatsu A, Ishiai M, et al. 1999. Identification of the SH2 Domain Binding Protein of Bruton's Tyrosine Kinase as BLNK---Functional

Significance of Btk-SH2 Domain in B-Cell Antigen Receptor-Coupled Calcium Signaling. *Blood* Vol. 94; 2357-2364.

55. Turner M and Billadeau DD. 2002. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol.* 2:476-486.

56. Holsinger LJ, Graef IA, Swat W, et al. 1998. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol.* 8:563-573.

57. Zhang R, Alt FW, Davidson L, Orkin SH, Swat W. 1995. Defective signaling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature.* 374:470-473.

58. Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T. 2002. Vav3 Modulates B Cell Receptor Responses by Regulating Phosphoinositide 3-Kinase Activation. *J Exp Med.* Vol. 195; 189-200.

59. Cyster JG and Goodnow CC. 1995. Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity.* 2:13-24.

60. Otipoby KL, Draves KE, Clark EA. 2001. CD22 Regulates B Cell Receptor-mediated Signals via Two Domains That Independently Recruit Grb2 and SHP-1. *J Biol Chem.* Vol. 276; 44315-44322.

61. Pappu R, Cheng AM, Li B, et al. 1999. Requirement for B Cell Linker Protein (BLNK) in B Cell Development. *Science.* Vol. 286; 1949-1954.

62. Okada T, Maeda A, Iwamatsu A, Gotoh K, Kurosaki T. 2000. BCAP: The Tyrosine Kinase Substrate that Connects B Cell Receptor to Phosphoinositide 3-Kinase Activation. *Immunity.* 13:817-827.

63. Marshall AJ, Niiro H, Lerner CG, et al. 2000. A Novel B Lymphocyte-associated Adaptor Protein, Bam32, Regulates Antigen Receptor Signaling Downstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J Exp Med.* Vol. 191;1319-1332.

64. Niiro H, Maeda A, Kurosaki T, Clark EA. 2002. The B Lymphocyte Adaptor Molecule of 32 kD (Bam32) Regulates B Cell Antigen Receptor Signaling and Cell Survival. *J Exp Med.* Vol. 195;:143-149.

65. Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, et al. 2000. CD19 Regulates Src Family Protein Tyrosine Kinase Activation in B Lymphocytes through Processive Amplification. *Immunity.* 13:47-57.

66. Pierce SK. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2:96-105.

67. Gupta N and DeFranco AL. 2007. Lipid rafts and B cell signaling. *Sem Cell & Dev Biol.* 18:616-626.

68. Lund FE, Cockayne DA, Randall TD, Solvason N, Schuber F, Howard MC. 1998. CD38: A new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev.* 161:79-93.

69. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, et al. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science.* 262:1056-1059.

70. Funaro A and Malavasi F. 1999. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents.* 13:54-61.

71. Moreno-Garcia ME, Partida-Sanchez S, Primack J, et al. 2004. CD38 is expressed as noncovalently associated homodimers on the surface of murine B lymphocytes. *Eur J Biochem.* 271:1025-1034.
72. Munshi C, Thiel DJ, Mathews II, Aarhus R, Walseth TF, Lee HC. 1999. Characterization of the Active Site of ADP-ribosyl Cyclase. *J Biol Chem.* Vol. 274; 30770-30777.
73. Santos-Argumedo L, Teixeira C, Preece G, Kirkham PA, Parkhouse RME. 1993. A B lymphocyte surface molecule mediating activation and protection from apoptosis via calcium channels. *J Immunol.* 151:3119-3130.
74. Kirkham PA, Santos-Argumedo L, Harnett MM, Parkhouse RME. 1994. Murine B-cell activation via CD38 and protein tyrosine phosphorylation. *Immunology.* 83:513-516.
75. Funaro A, Morra M, Calosso L, Zini MG, Ausiello CM, Malavasi F. 1997. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens.* 49:7-15.
76. Lund FE, Muller-Steffner H, Romero-Ramirez H, et al. 2006. CD38 induces apoptosis of a murine pro-B leukemic cell line by a tyrosine kinase-dependent but ADP-ribosyl cyclase- and NAD glycohydrolase-independent mechanism. *Int Immunol.* 18:1029-1042.
77. Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, et al. 2007. Chemotaxis of Mouse Bone Marrow Neutrophils and Dendritic Cells Is Controlled by ADP-Ribose, the Major Product Generated by the CD38 Enzyme Reaction. *J Immunol.* Vol. 179; 7827-7839.
78. Partida-Sánchez S, Goodrich S, Kusser K, Oppenheimer N, Randall TD, Lund FE. 2004. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: Impact on the development of humoral immunity. *Immunity.* 20:279-291.
79. Kumagai MA, Coustan-Smith E, Murray DJ, et al. 1995. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J Exp Med.* 181:1101-1110.
80. Kikuchi Y, Yasue T, Miyake K, Kimoto M, Takatsu K. 1995. CD38 ligation induces tyrosine phosphorylation of Bruton tyrosine kinase and enhanced expression of interleukin 5-receptor α chain: Synergistic effects with interleukin 5. *PNAS.* 92:11814-11818.
81. Donís-Hernández FR, Parkhouse RME, Santos-Argumedo L. 2001. Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *Eur J Immunol.* 31:1261-1267.
82. Jackson DG and Bell JI. 1990. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol.* 144:2811-2815.
83. Malavasi F, Funaro A, Alessio M, et al. 1992. CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin & Lab research.* 22:73-80.
84. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. 1996. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB Journal.* 10:1408-1417.
85. Deaglio S, Morra M, Mallone R, et al. 1998. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol.* 160:395-402.

86. Nishina H, Inageda K, Takahashi K, Hoshino S, Ikeda K, Katada T. 1994. Cell Surface Antigen CD38 Identified as Ecto-Enzyme of NAD Glycohydrolase Has Hyaluronate-Binding Activity. *Biochem and Biophys Res Commun.* 203:1318-1323.
87. Wykes MN, Beattie L, Macpherson GG, Hart DN. 2004. Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses. *Immunology.* 113:318-327.
88. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, et al. 1994. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes: Role of the human CD38 molecule. *J Immunol.* 153:952-959.
89. Stevenson GT. 2006. CD38 as a therapeutic target. *Mol Med.* 12:345-346.
90. Moreno-García ME, López-Bojórques LN, Zentella A, Humphries LA, Rawlings DJ, Santos-Argumedo L. 2005. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)- γ 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. *J Immunol.* 174:2687-2695.
91. Manjarrez-Orduño N, Moreno-García M, Fink K, Santos-Argumedo L. 2007. CD38 cross-linking enhances TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur J Immunol.* Vol. 37; 358-367.
92. Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, et al. 2007. CD38/CD19: A lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood.* 109:5390-5398.
93. Lund FE, Yu N, Kim KM, Reth M, Howard MC. 1996. Signaling Through CD38 Augments B Cell Antigen Receptor (BCR) Responses and Is Dependent on BCR Expression. *J Immunol.* 157:1455-1467.
94. Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, et al. 2007. Chemotaxis of Mouse Bone Marrow Neutrophils and Dendritic Cells Is Controlled by ADP-Ribose, the Major Product Generated by the CD38 Enzyme Reaction. *J Immunol.* Vol. 179;7827-7839.
95. Santos-Argumedo L, Lund FE, Heath AW, et al. 1995. CD38 unresponsiveness of xid B cells implicates Bruton's tyrosine kinase (btk) as a regulator of CD38 induced signal transduction. *Int Immunol.* 7:163-170.
96. Yasue T, Nishizumi H, Aizawa S, et al. 1997. A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5. *PNAS.* 94:10307-10312.
97. Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, et al. 1999. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science.* 285:113-116.
98. Niiro H, Clark EA. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev immunol.* 12:945-56
99. Batten M, Groom J, Cachero TG, et al. 2000. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 192:1453-1465.
100. Muñoz P, Navarro MDC, Pavón EJ, et al. 2003. CD38 Signaling in T Cells Is Initiated within a Subset of Membrane Rafts Containing Lck and the CD3- ζ Subunit of the T Cell Antigen Receptor. *J Biol Chem.* 278:50791-50802.
101. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, et al. 1993. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science.* 261:358-361.
102. Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, et al. 1995. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity.* 3:549-560.

103. Chan VWF, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. 1997. Characterization of the B lymphocyte populations in lyn-deficient mice and the role of lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*. 7:69-81.
104. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, et al. 2002. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science*. 297:1031-1034.
105. Clayton E, Bardi G, Bell SE, et al. 2002. A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med*. 196:753-763.
106. Su TT, Guo B, Wei B, Braun J, Rawlings DJ. 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev*. 197:161-178.
107. Kövesdi D, Pászty K, Enyedi A, et al. 2004. Antigen receptor-mediated signaling pathways in transitional immature B cells. *Cell Signaling*. 16:881-889.
108. Jacob A, Cooney D, Pradhan M, Coggeshall KM. 2002. Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells. *J Biol Chem*. 277:23420-23426.

CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen

Juan Carlos Rodríguez-Alba,^{1,2} Miguel Enrique Moreno-García,¹ Claudia Sandoval-Montes,¹ Víctor Hugo Rosales-García,¹ and Leopoldo Santos-Argumedo¹

¹Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México, D.F., México; and ²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

CD38 is a surface receptor able to induce activation, proliferation, and survival of human and mouse lymphocytes; this molecule is expressed on the surface of both mature and immature B cells. In this work, the function of CD38 in the maturation of murine B lymphocytes in the spleen was analyzed. The results showed that CD38 is highly expressed on Transitional 2 (T2) B lymphocytes with an intermediate expression on Transitional 1 (T1) and ma-

ture follicular B cells (M). Correlating with a high expression of CD38, T2 cells are also larger and more granular than T1 or M B cells. T2 cells also showed high levels of other molecules, which indicate an activated phenotype. CD38 crosslinking induced proliferation and maturation of T2 B lymphocytes; in contrast, T1 subset died by apoptosis. Finally, CD38 stimulation of T2 B lymphocytes obtained from Btk-, Lyn-, or Fyn-deficient mice

showed a defective differentiation; similarly, drugs interfering with PI3K or ERK decreased the proliferation or differentiation of this subset. This suggests that these molecules participate in the CD38 signaling pathway. As a whole, the results indicate that CD38 plays an important role in the regulation of B cell maturation in the spleen. (Blood. 2008;111:000-000)

© 2008 by The American Society of Hematology

Introduction

CD38 is a 42-kilodalton (kDa) transmembrane glycoprotein widely expressed in hematopoietic tissue. This protein possesses ectoenzymatic and cellular receptor functions.^{1,2} The incubation of splenic B lymphocytes with anti-CD38 agonistic antibodies induces diverse effects, such as proliferation, calcium mobilization, protein phosphorylation, migration, and apoptosis.³⁻⁹ CD38 is expressed from early stages in the bone marrow,¹⁰ and its level of expression is regulated during maturation of B or T lymphocytes in both humans and mice.^{4,11,12} For this reason, CD38 is considered a marker of differentiation and activation of T and B lymphocytes.¹³⁻¹⁵ All these events may be regulated "in vivo" by putative ligands present in diverse cellular types.¹⁶⁻¹⁸ Although the structural requirements for their function are not clear, it has been suggested that CD38 may associate with distinct receptors, including the B-cell receptor (BCR), T-cell receptor, and CD19.¹⁹⁻²³ However, since the initial description of the anti-CD38 monoclonal antibody (mAb) NIM-R5, no functional association between CD38 with the BCR was noticed. Simultaneous, or step-by-step, addition of both reagents did not demonstrate additive or costimulatory effects.⁴ Previous reports have shown that anti-CD38 stimulation of mature splenic B cells induces their proliferation, which requires Bruton Tyrosine Kinase (Btk),^{24,25} Src family kinases Lyn and Fyn²⁶ or phosphatidylcholine-phospholipase C (PC-PLC)/phospholipase D but not phospholipase C-gamma 2 (PLC-γ2)²⁷ to activate the nuclear factor-kappa B (NF-κB).²⁸ In addition, there is some evidence that CD38 stimulation activates the extracellular signal-regulated kinase (Erk) in both B and T lymphocytes.^{9,22}

Previous reports have shown that anti-CD38 stimulation induces apoptosis of normal and progenitor human B cells.^{9,29,30} The

analysis of a murine pro-B leukemic cell line (Ba/F3) demonstrated that anti-CD38 stimulation induces apoptosis independently of their CD38 enzymatic activity. This independence was demonstrated by either the use of a blocking drug or catalytically inactive CD38.⁸ CD38-deficient mice have some defects in its humoral response; some of these defects have been explained through a deficient antigen presentation by dendritic cells; nevertheless, defects in B cells have not been fully explored.³¹ It has been shown that CD38 is expressed selectively during maturation of murine T and B cells, but the role of the molecule during these processes has not been analyzed.^{10,12}

B-cell development has been recently described in more detail,³²⁻³⁴ and immature B lymphocytes in the spleen have been subdivided into 2 subpopulations: transitional 1 (T1) and transitional 2 (T2), which can be differentiated from mature follicular B lymphocytes (M).³⁵ These subsets can be separated by the expression of surface markers, such as CD24, CD21, and CD23.³⁵⁻³⁷ T1s differentiate into T2s and then become mature B lymphocytes.³⁵ These subsets differentially respond to anti-IgM stimulation or to B-cell activating factor (BLyS, TALL-1, THANK, zTNF4).³⁸⁻⁴² In response to BCR crosslinking, T1s die by apoptosis, whereas T2s proliferate and differentiate toward mature B lymphocyte.⁴⁰ In addition, B-cell activating factor is required for the T1 to T2 transition.^{39,40} The signaling pathways for this maturation have been partially reported.^{41,43}

The main objective of this work was to analyze the role of CD38 during B-cell development, particularly in the last stages taking place in the spleen. First, the expression of CD38 was evaluated

Submitted August 16, 2007; accepted January 12, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 25, 2008; DOI 10.1182/blood-2007-08-107714.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

among T1, T2, and M subsets. Then, the proliferation, differentiation, and apoptosis in response to anti-CD38 stimulation were studied. In each case, the enzymatic activity of CD38 was also analyzed. Second, expression and functions of CD38 were evaluated in mice with defects in the kinases Lyn, Fyn, and Btk or through the use of drugs inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Erk and PLC- γ 2. The data demonstrated differences in T1 and T2 responsiveness to anti-CD38 stimulation. T2 subset proliferated and differentiated into mature B cells and required PI3K, Btk, Lyn, Fyn, and Erk signaling pathways; meanwhile the T1 subset died by apoptosis. In addition, the enzymatic activity of CD38 was not required for these phenomena. Together, these results indicate that CD38 signaling plays a critical role in B-cell maturation.

Methods

Mice

C57Bl/6 wild-type, C57Bl/6 CD38^{-/-}, B6.129 wild-type, B6.129 Lyn^{-/-}, B6.129 Fyn^{-/-}, BALB/c wild-type, and BALB/c XID were bred and maintained in the CINVESTAV animal facility. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of CINVESTAV. Female 6- to 8-week-old mice were used for all experiments.

Flow cytometry

Cell suspensions were prepared from splenocytes. Erythrocytes were depleted with 0.85% ammonium chloride solution. One million cells in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.01% Na₃ were stained with the following antibodies: anti-CD21-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-B220-SprD, anti-CD24-biotin, and anti-CD38-PE (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Then the cells were washed with phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.01% Na₃ and stained with streptavidin-APC (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA). After washing, the cells were fixed with 1% formaldehyde in phosphate-buffered saline. Data were collected in FACSCalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Other molecules were analyzed with the following antibodies: anti-IgM-PE, anti-IgD-PE, anti-CD5-PE, anti-MHC-II-PE, anti-CD44-PE, anti-CD25-PE, anti-CD23-PE (Southern Biotechnology Associates), and streptavidin-APC.

Purification of B-cell subpopulations

Spleen cell suspensions (2×10^8) from each strain of mice were stained with the following antibodies: anti-B220-PerCP (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), anti-CD21-FITC, anti-CD23-PE, and anti-CD24-biotin. After washing with RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), the cells were stained with streptavidin-APC. Then, the cells were sorted in a FACS Vantage cell sorter (BD Biosciences). Each purified population was collected in 0.5 mL of cold 10% fetal calf serum (Invitrogen). Viability evaluated by Trypan blue exclusion (Invitrogen) was above 95%. Cell numbers were adjusted and the cells were used immediately.

Proliferation, differentiation, and apoptosis assays

After sorting, 1 to 2×10^5 of each B subset was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 μ M nonessential amino acids (Sigma-Aldrich, St Louis MO), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 0.2 mg/mL penicillin (Invitrogen), 0.5 mg/mL streptomycin (Invitrogen), and 5.5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Invitrogen). In some experiments, cells were preincubated 30 minutes with each of the following drugs: 30 μ M LY294002 (PI3K inhibitor), 25 μ M PD98059 (Erk inhibitor), 200 nM U-73 122 (PLC- γ 2 inhibitor), or 200 nM of the inactive analog U-73 343 (all from Calbiochem, San Diego, CA), 100 μ M 8-bromo-cyclic adenosine diphosphate ribose (8-Br-cADPR) (Sigma-Aldrich), or vehicle alone. Cells in triplicate wells were stimulated with rat-IgG (50 μ g/mL), rat-IgG2a (50

μ g/mL) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), anti-CD38 (NIM-R5) (50 μ g/mL), F(ab')₂ anti-mouse IgM (10 μ g/mL) (Cappel Laboratories, Durham, NC), or lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli* 055:B5) (20 μ g/mL), with or without 200 U/mL interleukin-4 (IL-4, Genzyme, Cambridge, MA). The plates were incubated 24 and 48 hours at 37°C 8 hours before harvesting, the cells were pulsed with 1 μ Ci of [³H]-thymidine (25 Ci/mmol) (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) and then harvested. [³H]-Thymidine incorporated to DNA was quantified in the scintillation counter (LS 6500, Beckman Coulter, Fullerton, CA). To evaluate differentiation, the cells were stimulated as described above. In some experiments, a lower concentration of anti-CD38 (25 μ g/mL) or F(ab')₂ anti-mouse IgM (5 μ g/mL) was used. After incubation, the cells were harvested and washed with medium. Finally, they were restained with the primary antibodies previously described. For apoptosis, T1 B cells were stimulated as described above. They were harvested 12 and 24 hours after incubation and stained with Annexin V-biotin (BD Biosciences PharMingen) according to the manufacturer's instructions. After incubation, the cells were washed and stained with streptavidin-APC and propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich). In other experiments, the cells were permeabilized 2 hours with cold 90% methanol (Baker, Phillipsburg, NJ), and stained 15 minutes with PI. The data were collected in the FACS Vantage cell sorter and analyzed by FlowJo software.

Western blot

A total of 2 million T2 B cells were stimulated 1, 5, and 10 minutes with rat-IgG (50 μ g/mL), anti-CD38 (50 μ g/mL), or F(ab')₂ anti-mouse IgM (20 μ g/mL). After stimulation, the cells were lysed with a buffer containing 10 mM Tris/HCl (pH 7.3) (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich), 0.4 mM EDTA (Baker), 10 mM NaF (Sigma-Aldrich), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich), 2 μ g/mL aprotinin (Sigma-Aldrich), 2 μ g/mL leupeptin (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and 1% Nonidet P-40 (v/v) (Sigma-Aldrich). Equivalent protein quantities were loaded into a 10% gel (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with anti-phospho-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or anti-ERK-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The membranes were developed with anti-mouse-HRP (Zymed) or anti-rabbit-HRP antibodies (DakoCytomation, Dako North America, Carpinteria, CA). Finally, proteins were detected using ECL-Plus (GE Healthcare). In some experiments, the cells were preincubated 30 minutes with 30 μ M LY294002, 25 μ M PD98059 or the vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO).

Erk phosphorylation

A total of 1 million splenocytes were stimulated 10 minutes, as described in "Western blot." After stimulation, cells were fixed in 10% formaldehyde and permeabilized with cold 90% methanol. The cells were stained with mouse IgG₁ anti-phospho-p42/44 MAPK and then goat anti mouse IgG₁-PE (Southern Biotechnology Associates). The cells were restained with anti-CD21-FITC, anti-CD24-biotin, and then APC-streptavidin. Data were collected in the FACS Vantage cell sorter and analyzed by FlowJo software. In some experiments, the cells were preincubated 30 minutes with 25 μ M PD98059 or the vehicle (DMSO).

Statistical analysis

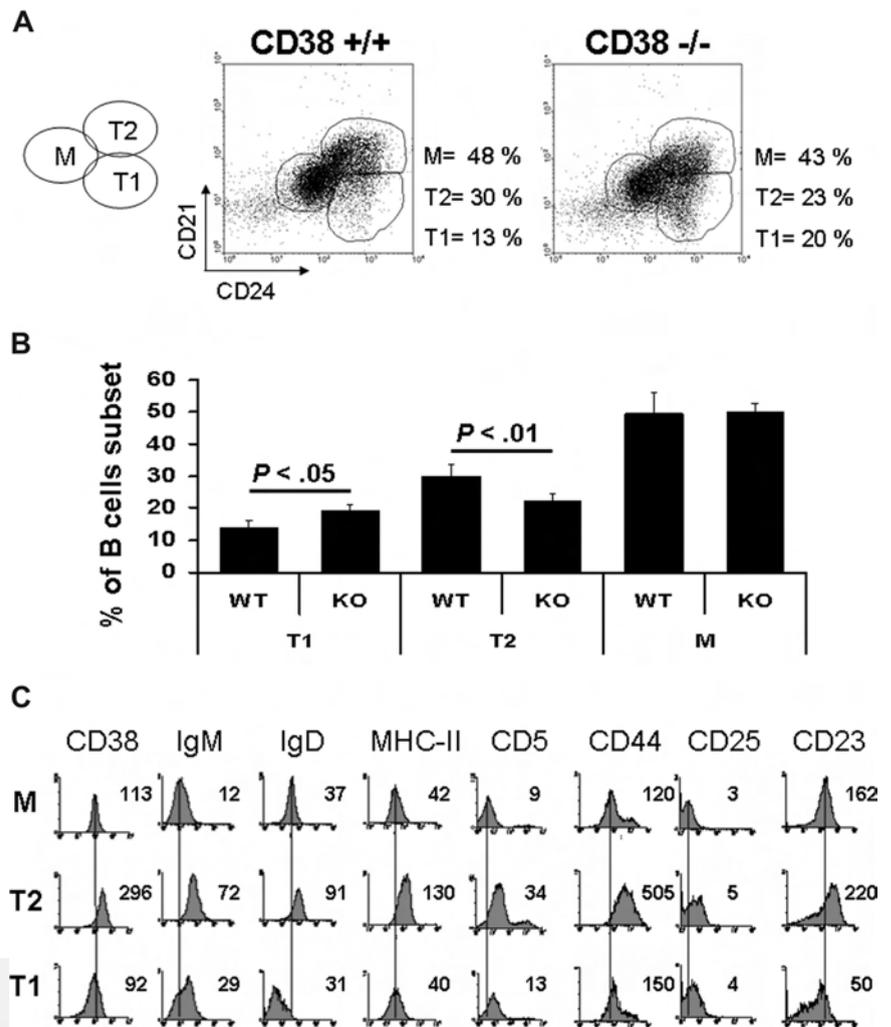
The statistical significance of all the indicated assays was assessed with the Student *t* test (*P* < .05 was considered significant).

Results

CD38 is differentially expressed during development of splenic B lymphocytes

A region containing B220-positive lymphocytes was created, and the percentage of T1 (CD24^{high}, CD21^{low}), T2 (CD24^{high}, CD21^{high}),

Figure 1. Transitional 1 B cells are increased and Transitional 2 B cells are decreased in CD38-deficient mice. Total splenic cells were gated on B220-positive cells (100%). Percentage of each subset was calculated according to the expression of CD21 and CD24. (A) Representative dot plots from wild-type and CD38-deficient mice. (B) Percentages of each population from 10 independent experiments. Results are expressed as mean plus or minus SD ($P < .05$ or $P < .01$ as indicated, Student *t* test). (C) A 4 color was used to analyze the expression of different surface markers. Each histogram shows the mean fluorescence intensity for each marker in every subpopulation.



and M (CD24^{low}, CD21^{intermediate}) B lymphocytes was evaluated according to Loder et al.³⁵ The results showed that the percentages of each subset in the wild-type mice were similar to previous reports (Figure 1A).^{35,40} The numbers of T2 B cells from CD38-deficient mice were diminished, whereas those from T1 B cells were higher compared with their wild-type mice counterpart (Figure 1A,B); both differences were statistically significant. CD38 was highly expressed on T2 cells compared with its expression on T1 and M B lymphocytes (Figure 1C). In addition, T2 B cells were larger and more granular (Figure S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) than T1 and M B lymphocytes. The expression of IgM, IgD, MHC-II, CD5, CD44, CD25, and CD23 was also evaluated (Figure 1C). The results showed that all these molecules were highly expressed on the T2 B-cell subset. As a whole, these results suggested that CD38 may participate during B-lymphocyte maturation, particularly in the transition from T1 to a mature phenotype.

CD38 engagement induces proliferation of T2 and M B lymphocytes

T1, T2, and M B cells were purified as reported^{35,40} to evaluate the proliferative response of B-cell subsets to anti-CD38 stimulation. The sorting analysis revealed 95% purity for each subset (Figure S2A). T1 B cells did not proliferate after anti-CD38 stimulation, but, in clear contrast, T2 and M B lymphocytes showed prolifera-

tion at 48 hours (Figure 2A). This effect increased in T2 and M B subpopulations with the addition of IL-4, whereas T1 subset did not respond even with this addition (Figure S2B).

CD38 enzymatic activity mediates cell migration.^{7,44} With the aim to analyze whether CD38 enzymatic activity has a role in the proliferation induced by the anti-CD38 mAb, T1 and T2 B cells were preincubated with 100 μ M 8-bromo-cyclic adenosine diphosphate ribose (8-Br-cADPR). This concentration has been demonstrated to block efficiently CD38 enzymatic functions without affecting the viability of the cells.⁸ As shown in Figure 2B, T1 B cells did not proliferate with or without the addition of 8-Br-cADPR. Despite the lack of proliferation with anti-CD38 or anti-IgM, T1 B cells were perfectly able to proliferate with LPS, which demonstrated that they were viable and ready to proliferate to an appropriate stimulus. In Figure 2B, T1 B cells from CD38-deficient mice show the same behavior than their counterpart from wild-type mice. The analysis of T2 B cells (Figure 2C) similarly showed that the cells can equally proliferate to anti-CD38 or BCR stimulation, which indicates that CD38 enzymatic activity was dispensable for the proliferation induced by the anti-CD38 mAb. This figure also shows that T2 B cells from CD38-deficient mice are similarly able to proliferate to BCR stimulation without any evident defect compared with their wild-type counterpart. These results suggest that CD38 is working as a receptor in the induction of proliferation of T2 B cells. As described for other

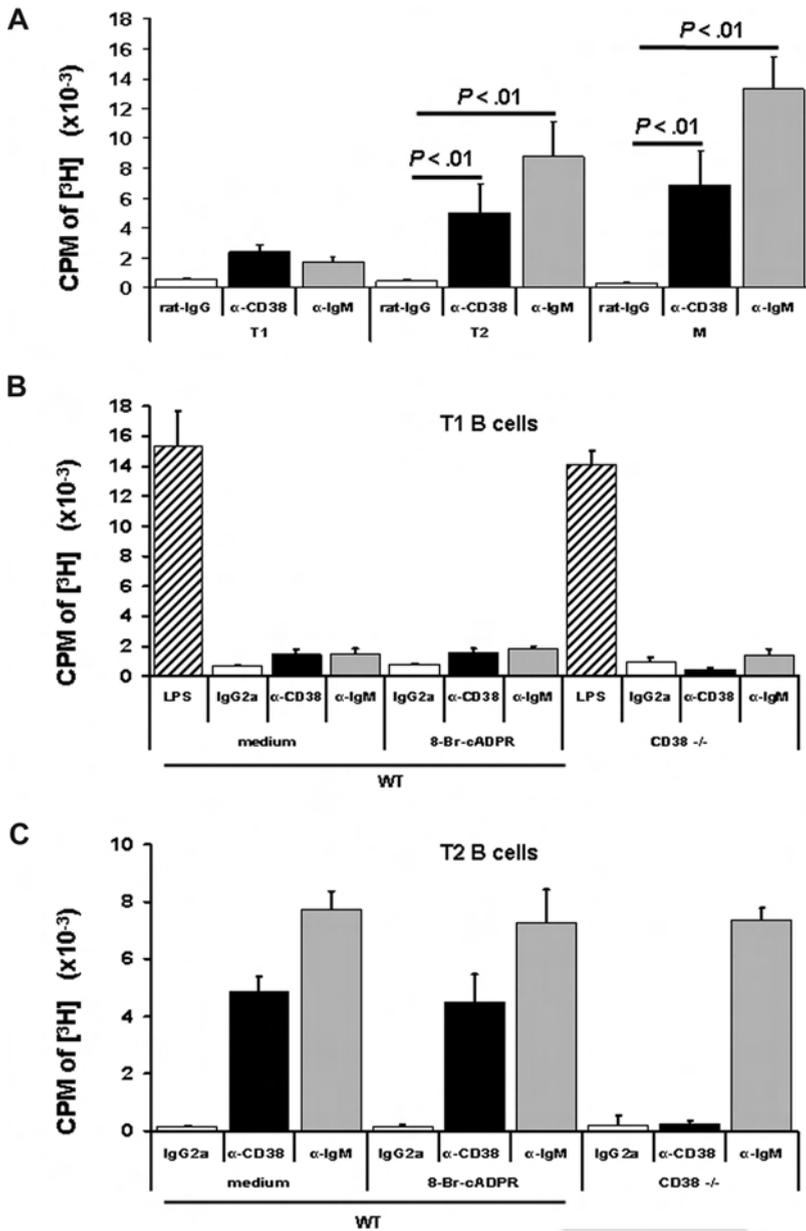


Figure 2. Anti-CD38 stimulation induces proliferation of transitional 2 B cells. Splenocytes from wild-type or CD38^{-/-} mice were stained for B220, CD21, and CD24. The cells were gated on B220-positive cells, and each population was purified according to its expression of CD21 and CD24. The purity of each subpopulation (T1, T2, or M) was more than 90%. (A) In 96-well plates, triplicates of each subset from wild-type mice were stimulated as indicated. (B) T1 B cells from wild-type or CD38^{-/-} mice were preincubated 30 minutes with 8-Br-cADPR or only medium. The cells, without washing, were then stimulated with rat-IgG2a (open bars), rat anti-mouse CD38 (rat IgG2a) (black bars), F(ab')₂ anti-mouse IgM (gray bars), or LPS (diagonal line bars). (C) T2 B cell subsets from wild-type or CD38^{-/-} mice were stimulated as in panel B except that LPS was not included. The plates were incubated 48 hours at 37°C. Each well was pulsed with 1 μCi of [³H] thymidine 8 hours before being harvested. Results are expressed as mean plus or minus SD from 3 independent experiments (*P* < .01 as indicated, Student *t* test).

systems, CD38 receptor activity seems to be independent of its enzymatic activity.^{8,45} The results also show that the behavior of T1 and T2 B cells from CD38-deficient mice is similar to that of their wild-type counterparts, at least in these assays.

Consistent with previous reports showing that splenic immature B lymphocytes exhibit differential responsiveness to BCR stimulation,⁴⁰ our data show that CD38 promotes proliferation of immature T2 B cells. However, CD38 stimulation is not able to induce the proliferation of T1 B lymphocytes. Of note, simultaneous, or step-by-step, addition of anti-CD38 and anti-IgM reagents did not show additive or costimulatory effects (data not shown), which indicates that these molecules may work independently.

Anti-CD38 stimulation promotes differentiation of T2 B lymphocytes

For these experiments, the “in vitro” assay previously described for B-cell differentiation was used.⁴⁰ Purified T1, T2, and M cells were cultured for 24 or 48 hours in the presence or absence of anti-CD38

mAb. Anti-CD38 stimulation induced the differentiation of T2 B cells toward a mature phenotype. The differentiation was observed after 24 hours of incubation, and it was clearly established at 48 hours (Figure 3A; Table 1). This effect was further improved with the addition of IL-4 (Figure S3A). Nevertheless, the differentiation was not observed in the T1 B cells (Figure S3B; Table 1); additionally, highly purified T2 B cells, lacking marginal zone B cells (Figure S4A), showed that CD38 induced their differentiation (Figure S4B). The addition of 8-Br-cADPR had no effect in the differentiation of T2 B cells induced by either anti-CD38 mAb or BCR stimulation (Figure 3A), which indicates that CD38-enzymatic activity is dispensable for this effect. Figure 3B shows similar results when half of the anti-CD38 dose was added to the culture and the cells were examined 48 hours later. Here it can be seen that the differentiation induced by the anti-CD38 mAb, although slightly less efficient, cannot be inhibited by 8-Br-cADPR. These results also show that, in these cells and for the assays described above, the function CD38 is independent of its enzymatic activity.

F3-T1

AQ: 22

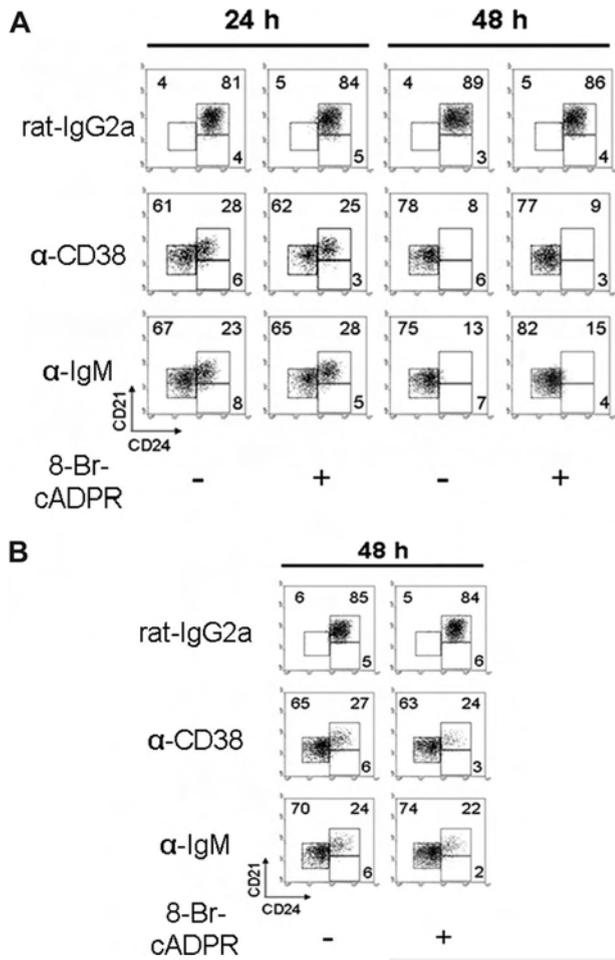


Figure 3. Anti-CD38 stimulation promotes T2 B lymphocyte differentiation. (A) T2 subsets, obtained as in Figure 2, were preincubated 30 minutes with 8-Br-cADPR or medium and activated with rat-IgG2a (50 μg/mL), anti-CD38 (50 μg/mL), or anti-IgM (10 μg/mL). Cells were harvested at 24 or 48 hours and restained to evaluate differentiation. (B) T2 B cells were preincubated as in panel A, activated with rat-IgG2a or anti-CD38 at (25 μg/mL) or anti-IgM (5 μg/mL) (Methods) for 48 hours, and restained as in panel A. Numbers in each dot plot indicate the percentage of cells and are representative from 3 independent experiments with similar results.

CD38 stimulation promoted apoptosis of T1 B cells

Early reports showed that anti-CD38 stimulation of human immature B cells induces apoptosis.⁹ Because immature T1 cells did not proliferate or differentiate after the anti-CD38 stimulation, the

Table 1. Differentiation of T1 and T2 B lymphocytes

| Differentiation, stimulus | 24 hours | 48 hours |
|---------------------------|--------------|---------------|
| T1 to T2 | | |
| Medium | ND | 9.90 ± 4.67 |
| Anti-CD38 | ND | 12.41 ± 5.54 |
| T2 to M | | |
| Medium | 10.66 ± 1.15 | 13.66 ± 4.04 |
| Rat-IgG2a | 8.33 ± 2.0 | 9.33 ± 2.04 |
| Anti-CD38 | 60.33 ± 2.52 | 77.66 ± 3.33* |

Purified T1 or T2 B subsets from wild-type mice were incubated 24 or 48 h as indicated. The differentiation is expressed by the percentage of B cell subsets in T2 or M regions (see Figures 3A, S3B). The results are expressed as mean ± SD from 3 independent experiments.

ND indicates not determined.

**P* < .01, comparing the differentiation induced by presence or absence of anti-CD38 (Student *t* test).

apoptosis of these cells was evaluated. Purified T1 cells were cultured 24 hours with anti-CD38. The results showed a high number of T1 B lymphocytes in the sub/G₀ area (Figure 4A), or Annexin V/PI-positive cells (Figure 4B), which indicated apoptosis. T1 cells were also evaluated at 12 hours with similar results (Figure S5A). The numbers of apoptotic T1 cells were reduced with the addition of IL-4; however, IL-4 did not sufficiently rescue the T1 subset from the apoptosis induced by CD38 stimulation (Figures 4A-B, S5A-B). The percentage of apoptosis of T1 B cells was significantly different (*P* < .01) in the absence or presence of anti-CD38 stimulation (Figure S5B). These results showed that anti-CD38 induced apoptosis of T1 B cells, similarly to what the anti-IgM did.⁴⁰ As described earlier, these experiments were also done in the presence of 8-Br-cADPR. As shown in Figure 4A, the addition of the inhibitor did not modify the results obtained in their absence. Thus, the ability of anti-CD38 mAb to induce the apoptosis of T1 B cells also seems to be independent of CD38 enzymatic activity.

CD38 stimulation requires Lyn, Fyn, PI3K, and Erk to induce proliferation of T2 B lymphocytes

The CD38 signaling pathway has been partially described.²⁴⁻²⁷ To evaluate whether these signaling molecules participate in the proliferation induced by anti-CD38, T2 B cells were purified from mice deficient in the expression of Lyn, Fyn, or wild-type mice. In addition, T2 B cells from wild-type mice were treated with the drugs LY294002 or PD98059, which interferes with PI3K or Erk

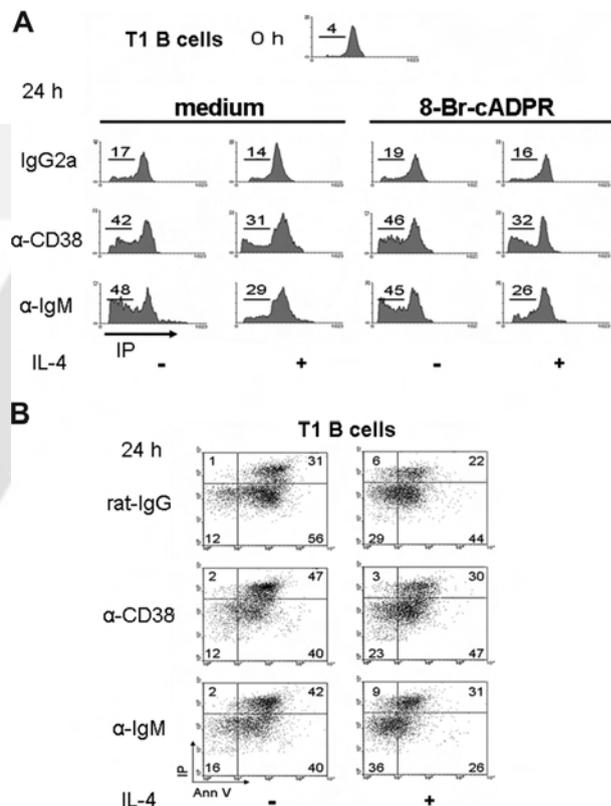


Figure 4. Apoptosis of T1 B lymphocytes on CD38 crosslinking. (A) T1 B cells, obtained as in Figure 2, were preincubated with 8-Br-cADPR or medium for 30 minutes, stimulated as indicated, and 24 hours later, permeabilized and stained with PI. The histograms show the content of DNA for each condition. The numbers represent the percentage of T1 B cell in SubG₀ region. (B) T1 B cells were activated as above and harvested and stained with Annexin V and PI. Numbers indicate the percentage of T1 B cells in each region. The dot plots are representative from 3 independent experiments with similar results.

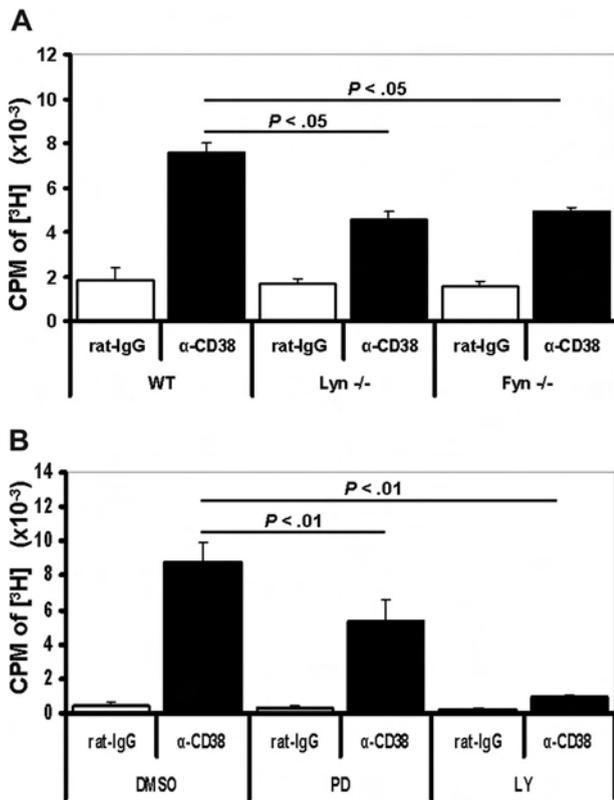


Figure 5. CD38 signaling requires Lyn, Fyn, PI3K, and Erk to induce proliferation of T2 B lymphocytes. (A) T2 B cells from Lyn^{-/-}, Fyn^{-/-}, or wild-type mice were stimulated 48 hours as indicated. (B) T2 B cells from wild-type mice were preincubated 30 minutes with DMSO, LY294002 (LY), or PD98059 (PD). Cells with the drug were stimulated as indicated above. Each well was pulsed with 1 μCi [³H] thymidine 8 hours before being harvested. Results are expressed as mean plus or minus SD from 3 independent experiments (*P* < .05 or *P* < .01 as indicated, Student *t* test).

activation, respectively. It was found that the proliferation induced after CD38 crosslinking was less effective in T2 B cells from Lyn- or Fyn-deficient mice (Figure 5A), which is consistent with previous reports that analyze whole splenic B cells.²⁴ Moreover, incubation of T2 B cells from wild-type mice with LY294002 or PD98059 also inhibited the proliferation of T2 B cells stimulated with anti-CD38 (Figure 5B).

CD38 requires Lyn, Fyn, Btk, PI3K, and Erk, but not PLC-γ2 to promote the differentiation of T2 B lymphocytes

CD38 stimulation requires several signaling molecules, but not PLC-γ2, to promote B-cell proliferation.²⁷ Purified T2 B lymphocytes were induced to differentiate by CD38 or BCR stimulation. The results showed that T2 B lymphocytes from mice deficient in the expression of Lyn, Fyn, or mice with defective Btk (Xid) did not differentiate on anti-CD38 stimulation (Figure 6A; Table 2). In addition, LY294002 or PD98059 interfered with the differentiation induced by anti-CD38 of T2 B cells from wild-type mice. Nevertheless, the PLC-γ2 inhibitor U-73 122 did not affect T2 B cell differentiation promoted by CD38, although it almost completely inhibited the differentiation induced by the BCR (Figure 6B; Table 3).

Anti-CD38 stimulation induces Erk phosphorylation in T2 B lymphocytes

Erk phosphorylation was evaluated by flow cytometry and Western blot assays. The results showed that CD38 crosslinking induced the

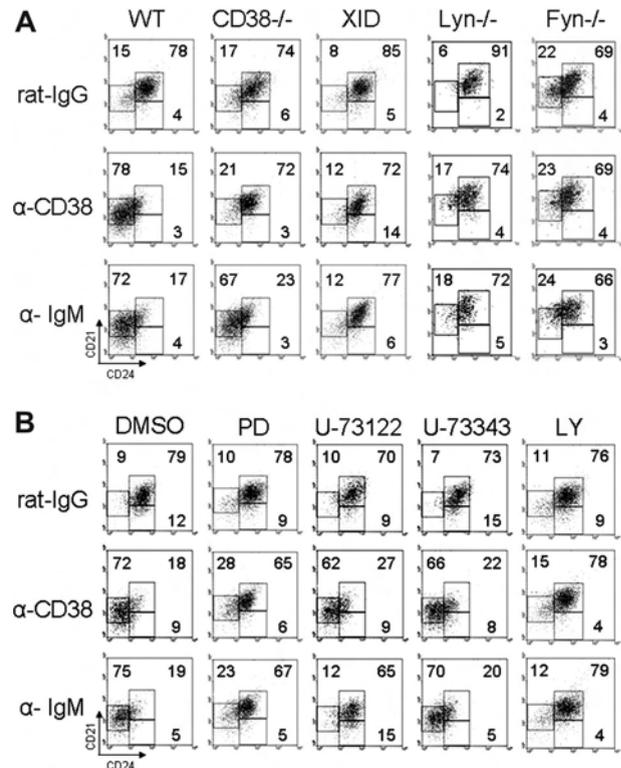


Figure 6. CD38 requires Lyn, Fyn, Btk, PI3K, and Erk, but not PLC-γ2 to promote differentiation of T2 B lymphocytes. (A) T2 B cells from CD38^{-/-}, Lyn^{-/-}, Fyn^{-/-}, Btk-deficient (Xid), or wild-type mice were stimulated 48 hours as indicated. (B) T2 B cells from wild-type mice were preincubated 30 minutes with inhibitory drugs and then stimulated as indicated, harvested at 48 hours, and restained with anti-B220, anti-CD21, and anti-CD24. The numbers show the percentage in each region and are representative from 3 independent experiments with similar results.

phosphorylation of Erk in splenic B cells from wild-type mice, but no phosphorylation was seen in mice deficient of CD38 (Figure 7A). The addition of the drug PD98059 inhibited the phosphorylation induced by anti-CD38, which suggested that Erk was activated in the T2 B cell subset. Moreover, Western blot assays showed that CD38 crosslinking induced the phosphorylation of Erk at 1, 5, or 10 minutes in purified T2 B lymphocytes from wild-type mice (Figure 7B). The incubation with the drugs LY294002 or PD98059 inhibited the phosphorylation of Erk (Figure 7B).

Discussion

The observation that CD38-deficient mice have decreased levels of T2, increased levels of T1, and stable M subsets was one of the key observations to begin this work. B-cell compartments have not been fully characterized in these mice; thus, the first task was to analyze the expression levels of CD38 among immature B cells. Once the differential levels of CD38 were observed among the 3 stages (Figure 1), the next step was to analyze whether those cells were able to respond to CD38 crosslinking. The data showed that purified T1 B cells did not proliferate or differentiate to T2 or M B lymphocytes after anti-CD38 stimulation; instead, they died by apoptosis. In contrast, purified T2 B lymphocytes proliferated and differentiated to mature B lymphocytes after CD38 crosslinking. None of these events required the enzymatic activity of CD38, which indicates that CD38 was acting only as a receptor. Thus, these results show a differential activity for CD38 in immature transitional B lymphocytes, which suggests that CD38 plays an

Table 2. Altered differentiation of T2 B cells in mice with signaling defects

| Stimulus | Mice | | | | |
|-----------|--------------|---------------------|---------------|--------------------|--------------------|
| | WT | CD38 ^{-/-} | XID | Lyn ^{-/-} | Fyn ^{-/-} |
| Rat-IgG | 13.61 ± 4.01 | 13.01 ± 1.10 | 10.33 ± 2.08 | 8.03 ± 2.10 | 13.33 ± 4.04 |
| Anti-CD38 | 74.83 ± 3.78 | 19.11 ± 2.01* | 13.33 ± 1.52* | 18.10 ± 1.0* | 20.66 ± 4.6* |

Purified T2 B cells from wild-type mice or mice deficient in the expression of CD38, Btk (XID), Lyn, or Fyn were stimulated 48 hours with anti-CD38. The differentiation of T2 B cells induced by anti-CD38 is expressed as the percentage of cells in the region of mature B lymphocytes (Figure 6A). The results are expressed as mean and standard deviation from 3 independent experiments

**P* < .01, comparing anti-CD38 induced differentiation among the different mice studied (Student *t* test).

important role in the generation of splenic mature B cells. In addition, the data show that purified T2 B cells from mice deficient in expression of Btk, Lyn, or Fyn have reduced ability to proliferate and, more importantly, they were impaired to mature after anti-CD38 stimulation. Similar results were obtained with the addition of drugs that inhibit PI3K or Erk signaling molecules. Together, these results suggest that CD38 participates in the development of immature B lymphocytes by inducing apoptosis of T1 but proliferation and maturation of T2 B lymphocytes.

CD38 is expressed during B-cell development, although a detailed analysis of its expression in immature B cells from the spleen has not been reported. In this regard, the data herein show that CD38 is highly expressed on T2 B cells compared with its expression on T1 or M B lymphocytes. Interestingly, the data showed that CD38-deficient mice have a reduced percentage of T2 B cells compared with that from wild-type mice. In addition, the number of T1 B lymphocytes was incremented in the CD38-deficient mice. This “arrest” in maturation suggests that CD38 participates in the proliferation and differentiation of immature B lymphocytes. An extensive analysis of the properties of T1s and T2s from the CD38-deficient mice is incomplete; however, the initial set of results, presented here, suggests that these cells do not behave differently compared with the same populations derived from wild-type mice. However, more work is needed to fully support the role of CD38 in these processes.

The results showed that T1 B cells did not proliferate or differentiate in response to CD38 crosslinking, but, as reported for human immature B cells,⁹ they died by apoptosis. In sharp contrast, CD38 stimulation induced proliferation of T2 B lymphocytes (Figures 2A,C, S2B) and their differentiation to a mature phenotype (Figures 3A-B, S3A). Interestingly, these results correlate with studies in which immature B lymphocytes, stimulated through BCR proliferate and differentiate if they are more mature (T2) or with the same stimulus, die by apoptosis if they are more immature (T1).^{39,40}

The ontogeny of B lymphocytes has been widely studied, and several reports have shown that 2×10^7 IgM⁺ B cells are daily generated in bone marrow; however, only 10% to 15% migrate to the spleen where they mature and differentiate.^{46,47} Several reports suggest that negative selection occurs at the immature B-cell stage. This negative selection has been studied “in vitro” by BCR

crosslinking.³⁹ Other groups have shown evidence of positive selection in marginal zone or B1 B cells^{48,49}; nevertheless, the requirements for B cell maturation are not completely elucidated. The presence of CD38 during B-cell ontogeny may suggest a role of this molecule in the maturation of B lymphocytes; however, apart from few studies in human B cells,⁹ its role in differentiation has not been explored. As also mentioned in the “Introduction” and in “Results,” anti-CD38 stimulation did not show additive or costimulatory effects. This apparent inconsistency represents another area of research because both molecules seem to regulate the same phenomena.

The signaling pathway driving maturation of T2 B cells after CD38 stimulation was analyzed. These results showed that CD38 stimulation partially requires Lyn, Fyn, and Erk to induce T2 B-cell proliferation; in addition, the data suggest that PI-3K is entirely required for CD38 to induce proliferation of this subset. Furthermore, CD38 promotes T2 B cell maturation and requires Lyn, Fyn, PI3K, Btk, and Erk, but not PLC- γ 2. Consistent with these results, several reports have shown that signaling defects in Btk, Lyn, PLC- γ 2, Fyn, or PI3K prevent maturation of B lymphocytes.^{41,43} These mice have reduced numbers of mature B cells but apparently intact T2 B cell pools.⁵⁰⁻⁵⁵ Thereby, this work demonstrates that CD38 exploits some of the molecules used by BCR signaling to induce proliferation and differentiation of T2 B lymphocytes; however, it also complements the observation that PLC- γ 2 is not required by CD38 signaling and this fact sustains that, although BCR and CD38 may use similar signaling pathways, there are some differences that may explain a differential or complementary role during B-cell activation and differentiation.

Finally, the MAPK Erk has been recently explored in CD38-dependent activation of human B cells by Deaglio et al.²² The present report shows that Erk is required to induce proliferation and differentiation of T2 B lymphocytes after CD38 stimulation. Consistent with previous reports,⁵⁶ this work shows that Erk is possibly activated downstream PI3K in T2 B cells after CD38 activation. CD38 may regulate differentiation in critical points of B-cell selection possibly by collaborating with the BCR²⁰ or other molecules, such as CD19.²² An area that requires further research is the mechanism through which CD38 “transmits” the signal from the cell surface to the nucleus. As shown in this and other articles,^{1,5,20-22,27} CD38 activates several

Table 3. Inhibition of T2 B lymphocyte differentiation by drugs interfering with signaling

| Stimulus | Inhibitor | | | | |
|-----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|
| | DMSO | PD98059 | U-73122 | U-73343 | LY294002 |
| Rat-IgG | 10.09 ± 1.73 | 8.66 ± 3.03 | 10.66 ± 1.01 | 9.33 ± 1.52 | 10.33 ± 1.05 |
| Anti-CD38 | 73.31 ± 5.0 | 23.33 ± 4.55* | 66.43 ± 3.78 | 68.66 ± 3.5 | 16.66 ± 2.1* |

T2 B lymphocytes from wild-type mice were preincubated 30 minutes with DMSO or one of the indicated inhibitors and then stimulated 48 hours with anti-CD38. The differentiation induced by anti-CD38 is expressed as the percentage of cells in the region of mature B lymphocytes (Figure 6B). The results are expressed as mean ± SD from 3 independent experiments.

**P* < .01, comparing anti-CD38 induced differentiation in the presence of different drugs or DMSO (Student *t* test).

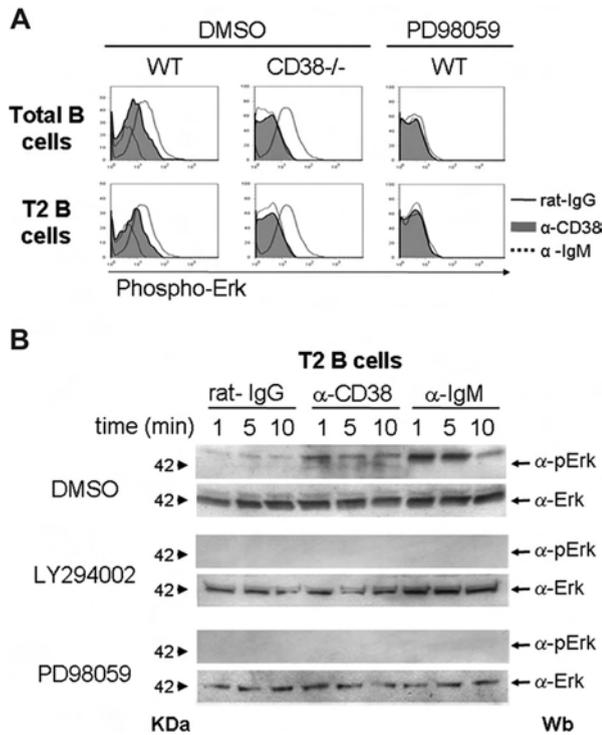


Figure 7. Erk is phosphorylated in T2 B lymphocytes on anti-CD38 stimulation, and this effect requires PI3-kinase activity. Total splenocytes from CD38^{-/-} or wild-type mice were preincubated with DMSO or PD98059 for 30 minutes and then activated 10 minutes with rat-IgG (black line), anti-CD38 (gray histogram), or anti-IgM (dotted line). After activation, the cells were stained for B220, CD21, CD24, and pErk as described in Methods. (A) Phosphorylation of total or purified T2 B lymphocytes. (B) T2 B cells from wild-type mice were preincubated with DMSO, LY294002, or PD98059 for 30 minutes and then activated 1, 5, or 10 minutes with rat-IgG, anti-CD38, or anti-IgM. Erk phosphorylation was analyzed by Western blot as described in Methods.

signaling pathways. So far it has not been possible to clearly demonstrate physical association of CD38 with transduction-signaling molecules, although several candidates have been

already reported.^{20,22} Although the participation of CD38 in B-cell development was analyzed in this work, it is necessary to elucidate the location of its “natural ligand” so these effects can be induced “in vivo.” The study of the CD38 and its “ligand” will contribute to the understanding of the biologic role of these molecules during the ontogeny of B lymphocytes. CD38 may also represent a target for treatment when an inappropriate B cell response, such as some forms of autoimmunity or some B cell lymphomas, is established.

Acknowledgments

The authors thank Hector Romero-Ramírez for his help and technical assistance, Ricardo Gaxiola-Centeno for taking care of the mice, and Dr Claudia González-Espinosa for providing B6.129 wild-type, B6.129 Lyn^{-/-}, and B6.129 Fyn^{-/-} mice.

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (40 218 and 56 836). This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D.Sc. degree of J.C.R.-A. at Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

Authorship

Contribution: J.C.R.-A. performed research, collected and analyzed data, and wrote the paper; M.E.M.-G. participated at the beginning of this research; C.S.-M. and V.H.R.-G. performed some flow cytometry and sorting experiments; L.S.-A. designed research, analyzed data, and wrote the paper; all the authors read and agree with the final version of the manuscript.

Conflict of interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Leopoldo Santos-Argumedo, Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, Col. Zacatenco, México, D.F., México; e-mail: lesantos@cinvestav.mx.

References

- Lund FE, Cockayne DA, Randall TD, Solvason N, Schuber F, Howard MC. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev*. 1998;161:79-93.
- Harada N, Santos-Argumedo L, Chang R, et al. Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker: homology to human CD38. *J Immunol*. 1993;151:3111-3118.
- Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993;262:1056-1059.
- Santos-Argumedo L, Teixeira C, Preece G, Kirkham PA, Parkhouse RME. A B lymphocyte surface molecule mediating activation and protection from apoptosis via calcium channels. *J Immunol*. 1993;151:3119-3130.
- Kirkham PA, Santos-Argumedo L, Harnett MM, Parkhouse RME. Murine B-cell activation via CD38 and protein tyrosine phosphorylation. *Immunology*. 1994;83:513-516.
- Funaro A, Morra M, Calosso L, et al. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*. 1997;49:7-15.
- Partida-Sánchez S, Goodrich S, Kusser K, Oppenheimer N, Randall TD, Lund FE. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity*. 2004;20:279-291.
- Lund FE, Muller-Steffner H, Romero-Ramirez H, et al. CD38 induces apoptosis of a murine pro-B leukemic cell line by a tyrosine kinase-dependent but ADP-ribosyl cyclase- and NAD glycohydrolase-independent mechanism. *Int Immunol*. 2006;18:1029-1042.
- Kumagai MA, Coustan-Smith E, Murray DJ, et al. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J Exp Med*. 1995;181:1101-1110.
- Donis-Hernández FR, Parkhouse RME, Santos-Argumedo L. Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *Eur J Immunol*. 2001;31:1261-1267.
- Funaro A, Malavasi F. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13:54-61.
- Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol*. 2005;77:513-521.
- Jackson DG, Bell JL. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol*. 1990;144:2811-2815.
- Malavasi F, Funaro A, Alessio M, et al. CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin Lab Res*. 1992;22:73-80.
- Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J*. 1996;10:1408-1417.
- Deaglio S, Morra M, Mallone R, et al. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol*. 1998;160:395-402.
- Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, et al. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes: role of the human CD38 molecule. *J Immunol*. 1994;153:952-959.
- Wykes MN, Beattie L, Macpherson GG, Hart DN. Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses. *Immunology*. 2004;113:318-327.
- Deterre P, Berthelot V, Bauvois B, Dalloul A, Schuber F, Lund F. CD38 in T- and B-cell functions. *Chem Immunol*. 2000;75:146-168.
- Lund FE, Yu N, Kim KM, Reth M, Howard MC. Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J Immunol*. 1996;157:1455-1467.
- Funaro A, De Monte LB, Dianzani U, Forni M, Malavasi F. Human CD38 is associated to distinct

- molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. *Eur J Immunol.* 1993;23:2407-2411.
22. Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, et al. CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood.* 2007;109:5390-5398.
 23. Muñoz P, Navarro MDC, Pavón EJ, et al. CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3- ζ subunit of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem.* 2003;278:50791-50802.
 24. Kikuchi Y, Yasue T, Miyake K, Kimoto M, Takatsu K. CD38 ligation induces tyrosine phosphorylation of Bruton tyrosine kinase and enhanced expression of interleukin 5-receptor α chain: synergistic effects with interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11814-11818.
 25. Santos-Argumedo L, Lund FE, Heath AW, et al. CD38 unresponsiveness of xid B cells implicates Bruton's tyrosine kinase (btk) as a regulator of CD38 induced signal transduction. *Int Immunol.* 1995;7:163-170.
 26. Yasue T, Nishizumi H, Aizawa S, et al. A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10307-10312.
 27. Moreno-García ME, López-Bojórques LN, Zentella A, Humphries LA, Rawlings DJ, Santos-Argumedo L. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)- γ 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. *J Immunol.* 2005;174:2687-2695.
 28. Kaku H, Horikawa K, Obata Y, et al. NF- κ B is required for CD38-mediated induction of C γ 1 germ-line transcripts in murine B lymphocytes. *Int Immunol.* 2002;14:1055-1064.
 29. Kitanaka A, Ito C, Coustan-Smith E, Campana D. CD38 ligation in human B cell progenitors triggers tyrosine phosphorylation of CD19 and association of CD19 with lyn and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol.* 1997;159:184-192.
 30. Kitanaka A, Ito C, Nishigaki H, Campana D. CD38-mediated growth suppression of B-cell progenitors requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and involves its association with the protein product of the c-cbl proto-oncogene. *Blood.* 1996;88:590-598.
 31. Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, et al. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 1998;92:1324-1333.
 32. Hardy RR. B-cell commitment: deciding on the players. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:158-165.
 33. Fuxa M, Skok JA. Transcriptional regulation in early B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:129-136.
 34. Ollila J, Vihinen M. B cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:518-523.
 35. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. B-cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 1999;190:75-89.
 36. Allman DM, Ferguson SE, Cancro MP. Peripheral B cell maturation: I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen(hi) and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol.* 1992;149:2533-2540.
 37. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation: II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol.* 1993;151:4431-4444.
 38. Petro JB, Gerstein RM, Lowe J, Carter RS, Shinnars N, Khan WN. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:48009-48019.
 39. Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med.* 1995;181:2129-2140.
 40. Su TT, Rawlings DJ. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B-cell development. *J Immunol.* 2002;168:2101-2110.
 41. Su TT, Guo B, Wei B, Braun J, Rawlings DJ. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev.* 2004;197:161-178.
 42. Batten M, Groom J, Cachero TG, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000;192:1453-1465.
 43. Kövesdi D, Pászty K, Enyedi A, et al. Antigen receptor-mediated signaling pathways in transitional immature B cells. *Cell Signal.* 2004;16:881-889.
 44. Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, et al. Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by ADP-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *J Immunol.* 2007;179:7827-7839.
 45. Manjarrez-Orduño N, Moreno-García ME, Fink K, Santos-Argumedo L. CD38 cross-linking enhances TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur J Immunol.* 2007;37:358-367.
 46. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. Selection events operating at various stages in B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2001;13:202-207.
 47. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:214-227.
 48. Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, et al. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science.* 1999;285:113-116.
 49. Martin F, Kearney JF. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity.* 2000;12:39-49.
 50. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science.* 1993;261:358-361.
 51. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:555-592.
 52. Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, et al. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity.* 1995;3:549-560.
 53. Chan VWF, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in lyn-deficient mice and the role of lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity.* 1997;7:69-81.
 54. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science.* 2002;297:1031-1034.
 55. Clayton E, Bardi G, Bell SE, et al. A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B-cell development and activation. *J Exp Med.* 2002;196:753-763.
 56. Jacob A, Cooney D, Pradhan M, Coggeshall KM. Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells. *J Biol Chem.* 2002;277:23420-23426.